



Joana Abreu Rodrigues

Licenciada em Biologia Celular e Molecular

Determinação da actividade antioxidante e composição fenólica de vinhos portugueses e correlação com parâmetros de cor

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar – Qualidade Alimentar

Orientadora: Doutora Maria Margarida Boavida Pontes Gonçalves,
Professora Auxiliar, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Doutora Benilde Mendes

Arguentes: Engenheiro Pedro Corrêa

Doutora Paula Duarte

Vogal: Doutora Margarida Gonçalves



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2011

Determinação da actividade antioxidante e composição fenólica de vinhos portugueses e correlação com parâmetros de cor

Direitos de cópia

O conteúdo da presente dissertação é da responsabilidade do autor.

Não é permitido reproduzir, todo ou em parte, o conteúdo desta dissertação, sem a autorização prévia do autor por escrito.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

O autor,

Joana Abreu Rodrigues

Agradecimentos

Queria agradecer a todos aqueles que, com a sua ajuda, cooperação e apoio possibilitaram este trabalho, muito especialmente:

Às Senhoras Professoras Doutoras Benilde Mendes e Margarida Gonçalves pela oportunidade, apoio, conhecimentos, conselho e orientação;

À Senhora Engenheira Guida Tralhão, ao Senhor Engenheiro Pedro Corrêa e à Agroeno, pela sua gentil disponibilidade e amostras facilitadas;

À Andreia e Ana Catarina, pela ajuda no desenvolvimento e aplicação de técnicas no laboratório;

A todos os meus colegas do *open space*, por serem a minha família fora de casa;

Ao restante pessoal do Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa, pela disponibilidade e ajuda;

À minha família, namorado e amigos, pelos conselhos, apoio incondicional, alento e compreensão.

Resumo

Este trabalho teve por objectivo a determinação da actividade antioxidante, perfil de compostos fenólicos e características de cor para 63 vinhos tintos, 21 vinhos brancos e 4 vinhos rosés, das regiões Península de Setúbal, Lisboa e Tejo. Para todos os vinhos, foi avaliado o poder de redução férrica (FRAP), a capacidade de sequestração do radical DPPH, a quantificação dos compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu, e identificação e quantificação de compostos fenólicos por HPLC-DAD. Alguns destes compostos foram identificados e quantificados, representando alguns dos grupos de fenólicos mais importantes do vinho: o ácido gálico (ácido benzóico), os ácidos cafeico e ferúlico (ácidos hidroxicinâmicos), o trans-resveratrol (stilbeno) e a quercetina (flavonol).

Os vinhos brancos e rosés foram submetidos a uma análise suplementar de actividade antiradicalar por fotoquimioluminescência. Relativamente às características de cor dos vinhos tintos, foram tidos em conta a intensidade, tonalidade, brilho e composição de cor. Os vinhos brancos da Estremadura, juntamente com os vinhos tintos produzidos a partir da casta Alicante Bouschet, destacam-se pela sua elevada actividade antioxidante medida através dos diferentes ensaios realizados. Alguns dos compostos fenólicos quantificados parecem ser exclusivos de determinado tipo de uva e outros parecem ser derivados dos métodos de vinificação aplicados ao vinho. Os componentes do vinho que lhe conferem propriedades antioxidantes actuam como agentes redutores e como agentes antiradicalares. Os componentes que conferem a coloração azul e amarela aos vinhos parecem possuir maior actividade antiradicalar e redutora do que os compostos que absorvem ao comprimento de onda característico do vermelho, indicando que a actividade antioxidante de um vinho não está muito relacionada com a sua coloração vermelha. De uma maneira geral, tanto nos vinhos brancos como nos vinhos tintos, os compostos que absorvem aos comprimentos de onda de 280, 320 e 360 nm participam na capacidade antioxidante dos vinhos.

Termos chave: Actividade antioxidante, vinhos portugueses, composição fenólica, parâmetros de cor

Abstract

This work was aimed at determining the antioxidant activity, the profile of phenolic compounds and the color characteristics for 63 red wines, 21 whites and 4 rosé wines, regions Setúbal Peninsula, Lisbon and Tagus. For these wines, we examined the ferric reducing power (FRAP), the ability to scavenge the DPPH radical and the total phenols content by the Folin-Ciocalteu method. The identification and quantification of the phenolic compounds present in these wines were further characterized by HPLC-DAD. Some of these phenolic compounds were identified and quantified phenolic groups representing some of the most important wine components as are the gallic acid (benzoic acid), caffeic and ferulic acids (hydroxycinnamic acids), trans-resveratrol (stilbene) and quercetin (flavonol).

The white and rosé wines were subjected to further analysis of activity by antiradicalar photochemiluminescence. For the color characteristics of red wines, were taken into account the intensity, hue, brightness and color composition. The white wines of Estremadura and the red wines produced from the Alicante Bouschet grape variety were distinguished by its high antioxidant activity as measured by different tests. Some of the quantified phenolic compounds appear to be unique to a particular type of grape and others appear to be derived from the vinification methods applied to wine. The wine components that confer antioxidant properties can act as both reducing agents and antiradicalar agents. The components that give wines the blue and yellow colors appear to have more antiradicalar activity and reduction potential than those that absorb in the characteristic wavelength of red color, indicating that the antioxidant activity of wine is not directly correlated with the percentage of red color. In general, both in white wines and red wines showed the presence of compounds that absorb at wavelengths of 280, 320 and 360 nm and are involved in the antioxidant capacity of wine.

Keywords: Antioxidant activity, Portuguese wines, phenolic composition, color parameters

Índice de matérias

1 – Introdução	1
1.1 – A produção de vinho em Portugal	1
1.1.1 – Cultura da vinha	2
1.1.2 – Castas utilizadas e sua distribuição nacional	4
1.1.3 – Processo de produção do vinho branco, do vinho tinto e do vinho rosé	6
1.1.4 – Cor do vinho	8
1.2 – Actividade antioxidante	9
1.2.1 – Composição fenólica do vinho	10
1.2.2 – Radicais livres e <i>stress</i> oxidativo	17
1.2.3 – Determinação da actividade antioxidante	19
1.3 – Objectivos	26
2 – Materiais e Métodos	29
2.1 – Amostragem	29
2.2 – Materiais, equipamento, reagentes e solventes	33
2.3 – Procedimento experimental	34
2.3.1 – Avaliação da actividade antioxidante	34
2.3.2 – Quantificação de compostos por HPLC-DAD	36
2.3.3 - Cor	37
3 – Resultados e Discussão	39
3.1 – Actividade antioxidante	41
3.1.1 – Poder antioxidante de redução férrica (FRAP)	42
3.1.2 – Actividade antiradicalar	47
3.1.3 – Determinação de compostos fenólicos totais – Reacção de Folin-Ciocalteu	55
3.2 – Determinação de compostos fenólicos por HPLC-DAD	59
3.3 - Cor	85
3.3.1 – Tonalidade, Intensidade e Brilho	85
3.3.2 – Composição de cor	89
	XI

3.4 – Correlações lineares entre os diversos parâmetros estudados	94
3.4.1 – Correlações entre as várias medidas de actividade antioxidante	94
3.4.2 – Correlações entre a actividade antioxidante e a absorvância na região do visível	95
3.4.3 – Correlações entre a actividade antioxidante e o perfil de compostos fenólicos obtido por HPLC	98
4 – Conclusões e Perspectivas futuras	101
5 – Bibliografia	105
6 – Anexos	113

Índice de figuras

Figura 1.1 – Regiões vitivinícolas em Portugal	1
Figura 1.2 – Produção de vinhos brancos, tintos e rosés na campanha de 2010-2011 nas diferentes regiões vitivinícolas de Portugal	2
Figura 1.3 – Enxertia em ómega da vinha	3
Figura 1.4 – Sistemas de condução da vinha	3
Figura 1.5 – Esquema do processo de produção dos vinhos branco, rosé e tinto	7
Figura 1.6 – Estrutura de flavonóides	11
Figura 1.7 – Estruturas de alguns flavonóis presentes no vinho	12
Figura 1.8 – Estrutura química de um flavonol	12
Figura 1.9 – Estrutura química de uma antocianidina ou antocianina aglícona	13
Figura 1.10 – Estrutura química de ácidos benzóicos e cinâmicos	14
Figura 1.11 – Estrutura química do trans-resveratrol	15
Figura 1.12 – Processo de formação de espécies reactivas de oxigénio	18
Figura 1.13 – Estrutura de alguns compostos antioxidantes	19
Figura 1.14 – Princípio do ensaio ORAC	20
Figura 1.15 – Princípio de poder de redução férrica	25
Figura 3.1 – Distribuição das amostras de vinho estudadas pelos respectivos anos de produção	39
Figura 3.2 – Distribuição da amostragem em termos de região e número de castas componentes (monocasta e multicasta)	40
Figura 3.3 – Distribuição das amostras por casta e região para os vinhos tintos e brancos monovarietais	40
Figura 3.4 – Distribuição das amostras por casta e região para os vinhos tintos e brancos multivarietais	41
Figura 3.5 – Poder antioxidante de redução férrica de vinhos tintos monovarietais	43
Figura 3.6 – Poder antioxidante de redução férrica de vinhos tintos multivarietais	43
Figura 3.7 – Poder antioxidante de redução férrica dos vinhos brancos monovarietais e multivarietais	45
Figura 3.8 – Poder antioxidante de redução férrica dos vinhos rosés monovarietais e multivarietais e comparação com valores médios desta propriedade obtidos para vinhos brancos e vinhos tintos	46

Figura 3.9 – Actividade anti-radicalar relativamente ao radical DPPH de vinhos tintos monovarietais	47
Figura 3.10 – Actividade anti-radicalar relativamente ao radical DPPH de vinhos tintos multivarietais	48
Figura 3.11 – Actividade antiradicalar dos vinhos brancos monovarietais e multivarietais relativamente ao radical DPPH	50
Figura 3.12 – Actividade antiradicalar dos vinhos rosés relativamente ao radical DPPH e comparação com os valores médios desta propriedade obtidos para os vinhos brancos e os vinhos tintos	51
Figura 3.13 – Actividade antiradicalar de vinhos brancos monovarietais e multivarietais relativamente ao radical anião superóxido, determinada por fotoquimioluminescência	52
Figura 3.14 – Actividade antiradicalar de vinhos rosés relativamente ao radical anião superóxido, determinada por fotoquimioluminescência, e comparação com os valores médios desta propriedade determinados para vinhos brancos	53
Figura 3.15 – Compostos fenólicos totais em vinhos tintos monovarietais	55
Figura 3.16 – Compostos fenólicos totais em vinhos tintos multivarietais	55
Figura 3.17 – Compostos fenólicos totais de vinhos brancos monovarietais e multivarietais	57
Figura 3.18 – Teor de compostos fenólicos em vinhos rosés e comparação com os valores médios encontrados em vinhos brancos e tintos	59
Figura 3.19 – Cromatograma obtido por injeção em HPLC-DAD de um vinho tinto (JR77), com detecção nas gamas de: a) 210 a 540 nm e b) 280 a 370	60
Figura 3.20 – Cromatograma obtido por injeção em HPLC-DAD de um vinho branco (JR37), com detecção nas gamas de: a) 210 a 540 nm e b) 280 a 370 nm	61
Figura 3.21 – Cromatograma obtido por injeção em HPLC-DAD de um vinho rosé (JR88), com detecção nas gamas de: a) 210 a 540 nm e b) 280 a 370 nm	62
Figura 3.22 – Áreas cromatográficas totais de compostos fenólicos com máximo de absorção a 280 nm (ácidos hidroxibenzóicos e flavanóis) para os vinhos tintos a) monovarietais e b) multivarietais das regiões de Lisboa, Península de Setúbal e Tejo	64
Figura 3.23 – Áreas cromatográficas totais de compostos fenólicos com máximo de absorção a 280 nm (ácidos hidroxibenzóicos e flavanóis) para os vinhos brancos das regiões de Lisboa, Península de Setúbal e Tejo	65
Figura 3.24 – Áreas cromatográficas totais de compostos fenólicos com máximo de absorção a 320 nm (ácidos hidroxicinâmicos e stilbenos) para os vinhos tintos a) monovarietais e b) multivarietais das regiões de Lisboa, Península de Setúbal e Tejo	66
Figura 3.25 – Áreas cromatográficas totais de compostos fenólicos com máximo de absorção a 320 nm (ácidos hidroxicinâmicos e stilbenos) para os vinhos brancos das regiões de Lisboa, Península de Setúbal e Tejo	67

Figura 3.26 – Áreas cromatográficas totais de compostos fenólicos com máximo de absorção a 360 nm (flavonóis) para os vinhos tintos a) monovarietais e b) multivarietais das regiões de Lisboa, Península de Setúbal e Tejo	68
Figura 3.27 – Áreas cromatográficas totais de compostos fenólicos com máximo de absorção a 360 nm (flavonóis) para os vinhos brancos das regiões de Lisboa, Península de Setúbal e Tejo	69
Figura 3.28 – Teor de ácido gálico em vinhos tintos monovarietais e multivarietais	73
Figura 3.29 – Teor de ácido cafeico em vinhos tintos monovarietais e multivarietais	74
Figura 3.30 – Teor de resveratrol em vinhos tintos monovarietais e multivarietais	76
Figura 3.31 – Teor de quercetina em vinhos tintos monovarietais e multivarietais	78
Figura 3.32 – Teor de ácido cafeico, ácido ferúlico e resveratrol em vinhos brancos monovarietais e multivarietais	81
Figura 3.33 – Teor de ácido gálico e ácido cafeico em vinhos brancos e rosés	82
Figura 3.34 – Composição de cor de vinhos tintos multivarietais	89
Figura 3.35 – Composição de cor de vinhos tintos monovarietais	90

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 – Número de castas tintas e brancas autorizadas por região	5
Tabela 2.1 – Amostragem	29
Tabela 2.2 – Reagentes e solventes utilizados	33
Tabela 2.3 – Equipamento utilizado	33
Tabela 2.4 – Programa de eluentes aplicado	36
Tabela 3.1 – Valores de poder de redução férrica de vinhos tintos	42
Tabela 3.2 – Valores da actividade antiradicalar de vinhos tintos e rosés face ao DPPH	49
Tabela 3.3 – Valores da actividade antiradicalar de vinhos brancos face ao DPPH	51
Tabela 3.4 – Compostos fenólicos totais de vinhos tintos	56
Tabela 3.5 – Compostos fenólicos totais de vinhos brancos	58
Tabela 3.6 – Gamas de trabalho, equações e coeficientes de correlação das rectas de calibração construídas para os padrões de compostos fenólicos quantificados	70
Tabela 3.7 – Limites de detecção e de quantificação determinados no presente trabalho	70
Tabela 3.8 – Limites de detecção e de quantificação para alguns compostos fenólicos	71
Tabela 3.9 – Teor de compostos fenólicos individuais em vinhos tintos	72
Tabela 3.10 – Teor de compostos fenólicos individuais em vinhos brancos	79
Tabela 3.11 – Tonalidade, Intensidade e Brilho de vinhos tintos monovarietais	87
Tabela 3.12 – Tonalidade, Intensidade e Brilho de vinhos tintos multivarietais	88
Tabela 3.13 – Composição de cor de vinhos tintos monovarietais	91
Tabela 3.14 – Composição de cor de vinhos tintos multivarietais	92
Tabela 3.15 – Coeficientes de correlação de Pearson das relações lineares entre os parâmetros descritivos da actividade antioxidante de vinhos brancos e tintos da região de Lisboa	94
Tabela 3.16 – Coeficientes de correlação de Pearson das relações lineares entre parâmetros descritivos da actividade antioxidante de vinhos da região de Lisboa e a respectiva absorvância avaliada aos comprimentos de onda de 420 nm, 520 nm e 620 nm	96

Tabela 3.17 – Coeficientes de correlação de Pearson das relações lineares entre parâmetros descritivos da actividade antioxidante de vinhos da região de Lisboa e os parâmetros tonalidade, intensidade, brilho (vinhos tintos) e composição da cor (vinhos tintos e brancos) 97

Tabela 3.18 – Coeficientes de correlação de Pearson das relações lineares entre parâmetros descritivos da actividade antioxidante de vinhos da região de Lisboa e as áreas totais dos cromatogramas obtidos em HPLC com detecção selectiva aos comprimentos de onda de 280 nm, 320 nm e 360 nm 98

Tabela 3.19 – Coeficientes de correlação de Pearson entre parâmetros descritivos da actividade antioxidante de vinhos da região de Lisboa e as concentrações de alguns componentes fenólicos individuais 100

1 – Introdução

1.1 – A produção de vinho em Portugal

A produção de vinho em Portugal é definida por diversos factores consoante a região de produção e as suas características, assim como o próprio tipo de vinho produzido. Entre estes factores incluem-se, a cultura da vinha, os diferentes processos de produção de vinho e a escolha das castas utilizadas.

Existem em Portugal 13 regiões vitivinícolas (Figura 1.1) contribuindo para uma produção total de 7.119.903 hectolitros de vinho na campanha de 2010-2011. De acordo com dados apresentados pelo Instituto da Vinha e do Vinho, a produção de vinhos tintos e rosés é predominante, representando 79% da produção total, isto é 5.045.425 hectolitros, e a produção de vinhos brancos representa 21% da produção total, ou seja 2.074.478 hectolitros.



Figura 1.1 – Regiões vitivinícolas em Portugal (adaptado de Ministério da Agricultura e Pescas)

1– Vinhos Verdes; 2– Trás-os-Montes; 3– Terras Durienses; 4– Beira Atlântico, Terras do Dão e Terras da Beira; 5– Tejo; 6– Lisboa; 7– Alentejo; 8– Península de Setúbal; 9– Algarve; 10– Madeira; 11– Açores

As regiões de Terras Durienses, Lisboa e Alentejo, combinadas, contribuem para mais de 50% de todo o vinho produzido em Portugal, sendo assim as principais regiões produtoras de vinho do país. As

regiões com menor contribuição são Trás-os-Montes, Algarve, Madeira e Açores, representando menos de 3% da produção total de vinho a nível nacional.

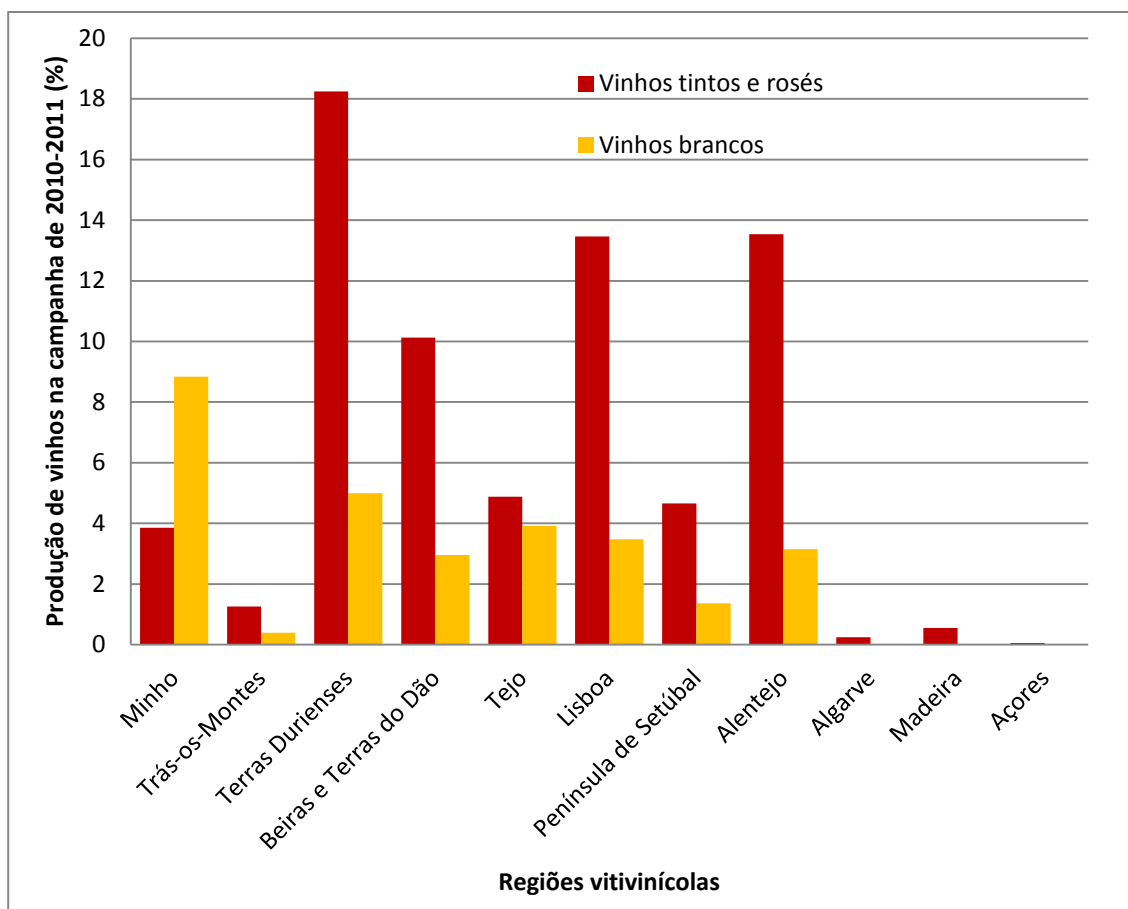


Figura 1.2 – Produção de vinhos brancos, tintos e rosés na campanha de 2010-2011 nas diferentes regiões vitivinícolas de Portugal. (Dados obtidos do Instituto da Vinha e do Vinho)

1.1.1 – Cultura da vinha

A qualidade do vinho depende de inúmeros factores de produção que não podem ser negligenciados, sendo o primeiro destes factores a cultura da vinha.

Em primeiro lugar, o solo e clima (juntamente com o factor humano constituem o *terroir*) devem ser adequados e com condições óptimas para o crescimento e desenvolvimento da vinha. De facto, o solo funciona como a principal fonte de nutrientes da planta, sendo então necessário assegurar que não se torne num factor limitante do crescimento e desenvolvimento da videira, podendo por vezes recorrer-se à fertilização do mesmo assim como ao aumento da drenagem interna do solo. É igualmente essencial que as plantas sejam plantadas de forma a proporcionar espaço suficiente para o desenvolvimento apropriado das raízes (Grainger & Tattersall, 2005; Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006a; Jackson, 2008).

Em segundo lugar, é necessário ter em conta o binómio porta-enxerto/planta. O porta-enxerto consiste numa raiz de videira de origem americana (planta *Vitis Americana*) resistente a algumas doenças às quais as videiras europeias são susceptíveis. A enxertia (Figura 1.3) pode ser realizada de acordo com métodos diferentes, sendo o objectivo acoplar as raízes de origem americana ao resto da planta (folhas, caule e uva) de origem europeia. O porta-enxerto tem a sua importância no que se refere ao vigor da videira, a sua adaptabilidade ao solo e à sua precocidade/atraso na maturação. A escolha da casta é condicionada pelos objectivos de produção, o solo e o clima, sendo que a escolha da casta pode condicionar o porta-enxerto e vice-versa (Grainger & Tattersall, 2005; Jackson, 2008).

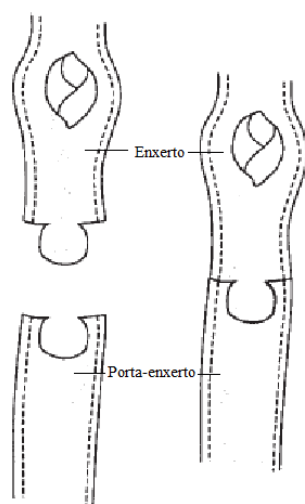


Figura 1.3 – Enxertia em ômega da vinha (Adaptado de Jackson, 2008)

Em terceiro lugar, a plantação e a condução da vinha devem ser feitas de modo a otimizar a sua cultura. A condução da vinha consiste essencialmente na maneira em como se dispõem as plantas, existindo métodos tradicionais e outros mais modernos (Figura 1.4), com um objectivo último de maximizar a captação da luz e evitar o ensombramento das folhas, assim como o adequado arejamento do interior do bardo (cachos e folhas) (Grainger & Tattersall, 2005; Jackson, 2008).

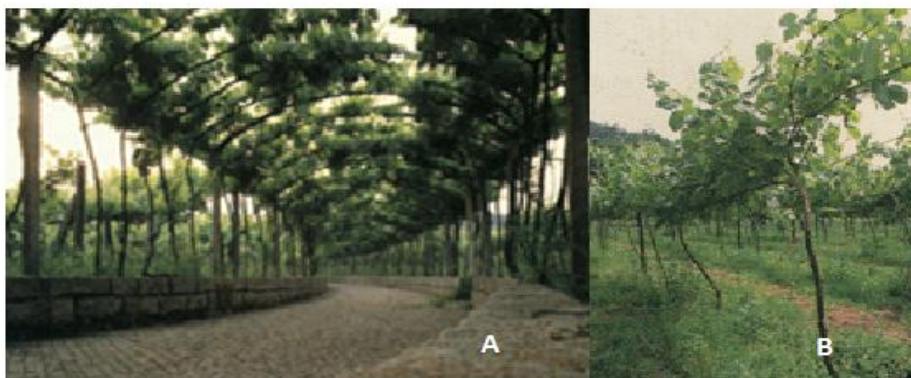


Figura 1.4 – Sistemas de condução da vinha.

A – Método em ramadas (tradicional); B – Método em cordão (moderno)
(<http://www.vinhosverdes.pt>)

Em quarto lugar, a poda e a empa são factores a considerar aquando da cultura da vinha. A poda consiste no corte de uma parte dos ramos e pode ser feita após a vindima, como controlo da disposição aeroespacial da videira de modo a controlar a produção (poda de Inverno), ou quando a videira já tem folhas (poda em verde), de forma a favorecer os rebentos escolhidos (objectivo de formação), ou ainda favorecer um cacho em detrimento de outro, arejar o bardo e aumentar a exposição (objectivos de produção). A empa consiste no posicionamento adequado da vara resultante da poda em redor de um arame, de modo a assegurar que a seiva atinja todas as extremidades da planta, ou seja, para assegurar o controlo da dominância apical, permitindo assim o seu correcto crescimento e desenvolvimento (Grainger & Tattersall, 2005; Jackson, 2008).

Em quinto lugar, é essencial ter em conta as intervenções em verde e os diferentes tratamentos que se podem aplicar às vinhas. As intervenções em verde realizam-se quando a vinha se encontra em estado vegetativo, com o objectivo de melhorar a qualidade do desenvolvimento da planta e amadurecimento das uvas, mas também facilitar a posterior aplicação de tratamentos fitossanitários que variam consoante a região, o tipo de casta plantada, o tipo de solo, o ano, as doenças e ainda o número de pulverizações e tipo de fungicida aplicado (Grainger & Tattersall, 2005; Jackson, 2008).

Finalmente, a rega e a vindima constituem aspectos importantes na cultura da vinha. De facto, o aporte em água é necessário no crescimento vegetativo das bagas assim como durante o seu amadurecimento, sendo prejudicial em quantidades excessivas. A vindima deve ser realizada quando a uva se encontra no estado de maturação ideal, momento que depende dos objectivos traçados, quando a acidez é mais baixa e os teores em açúcares mais elevados, sendo possível prever o teor de álcool no produto final (Grainger & Tattersall, 2005; Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006a; Jackson, 2008).

1.1.2 – Castas utilizadas e sua distribuição nacional

As castas utilizadas em Portugal para a produção de vinhos regionais variam de acordo com as características inerentes a cada uma das regiões vitivinícolas, quer seja a nível de solo ou a nível de condições climáticas. As castas autorizadas por região encontram-se descritas na legislação, sendo apresentadas na Tabela 1.1 as portarias que regulamentam o número e tipo de castas autorizadas para cada uma das regiões vitivinícolas em Portugal.

Tabela 1.1 – Número de castas tintas e brancas autorizadas por região

Região	Número de castas autorizadas	
	Tintas	Branças
Vinhos Verdes ou Minho (Portaria nº393/2001 de 16 de Abril)	32	31
Terras do Dão (Portaria nº593/2010 de 29 de Julho)	39	38
Terras da Beira (Portaria nº163/2011 de 18 de Abril)	36	35
Lisboa (Portaria nº426/2009 de 23 de Abril)	47	41
Alentejo (Portaria nº276/2010 de 19 de Maio)	29	29
Tejo (Portaria nº445/2009 de 27 de Abril)	45	44
Península de Setúbal (Portaria nº695/2009 de 29 de Junho)	151	138
Algarve (Portaria nº817/2006 de 16 de Agosto)	28	21
Açores (Portaria nº853/2004 de 19 de Julho)	14	18
Madeira (Portaria nº86/2004 de 2 de Abril)	12	14
Trás-os-Montes (Portaria nº1203/2006 de 9 de Novembro)	34	33
Terras Durienses (Portaria nº1197/2006 de 7 de Novembro)	80	62
Beira Atlântico (Portaria nº238-A/2011 de 16 de Junho)	48	46

Apesar de existir um elevado número de castas autorizadas por região, o número de castas comumente utilizado é bastante inferior e varia de uma região para outra. As castas brancas autóctones mais utilizadas são Alvarinho, Antão Vaz, Arinto, Encruzado, Fernão Pires, Loureiro, Sória e Vital, enquanto as castas brancas não autóctones mais utilizadas são Chardonnay e Sauvignon. Por outro lado, as castas tintas autóctones mais utilizadas são Alfrocheiro, Aragonez, Baga, Castelão, Touriga Franca, Touriga Nacional e Trincadeira, enquanto as castas tintas não autóctones mais utilizadas são Alicante Bouschet, Cabernet Sauvignon e Syrah.

Uma característica comum entre as castas Alfrocheiro, Baga, Touriga Franca e Alicante Bouschet é o facto de serem uvas ricas em pigmentos, originando vinhos com uma coloração rica e intensa. As primeiras três castas caracterizam-se pelas uvas possuírem polpa incolor, ou seja a coloração provem

da película, enquanto a última casta é a única tintoreira, entre as uvas mencionadas, ou seja, a coloração provém tanto da película como da polpa.

1.1.3 – Processo de produção do vinho branco, do vinho tinto e do vinho rosé

Durante as etapas prévias à produção de vinho, ou seja, durante a vindima, o transporte e a recepção, é essencial ter em atenção a qualidade das uvas seleccionadas, de modo a evitar qualquer tipo de contaminação ou fermentação precoce e assegurar assim as condições essenciais para a produção de um vinho de elevada qualidade. O desengace consiste na separação mecânica entre os bagos de uva e o seu suporte linhocelulósico (o engaço) e o esmagamento consiste na libertação da polpa e do sumo da uva mediante o rompimento da película. Durante o desengace e o esmagamento, é necessário evitar a presença de pequenos fragmentos de pedúnculos no mosto e esmagar em demasia as grainhas pois estes componentes da uva conferem características de adstringência e amargura que irão afectar negativamente as propriedades organolépticas do produto final. (Grainger & Tattersall, 2005; Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006a; Jackson, 2008).

O esquema do processo de produção dos vinhos branco, rosé e tinto é apresentado na Figura 1.5, e evidencia as diferenças nos processos de vinificação destes três tipos de vinhos nomeadamente a nível dos processos de maceração e dos processos de fermentação.

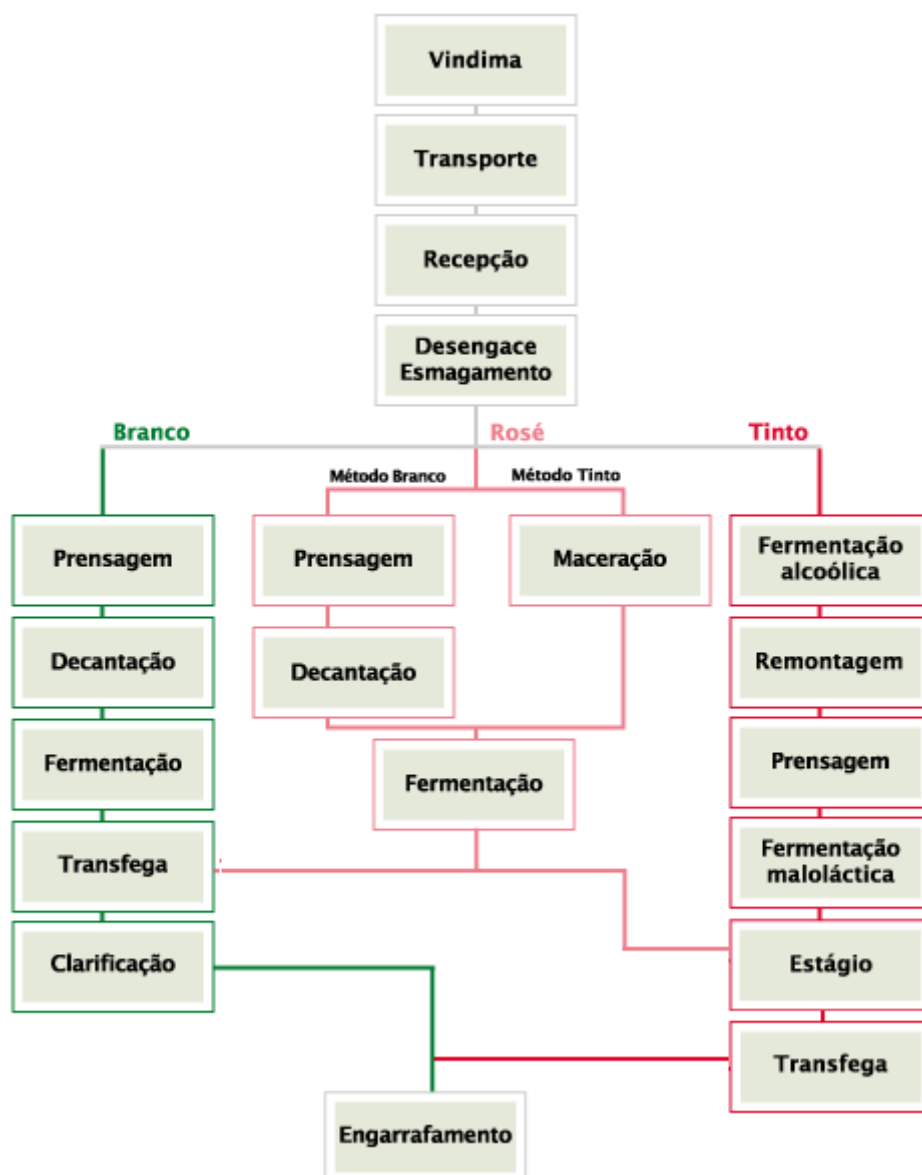


Figura 1.5 – Esquema do processo de produção dos vinhos branco, rosé e tinto (<http://www.infovini.com>)

1.1.3.1 – Processo de produção do vinho tinto

A seguir ao desengace e esmagamento, o mosto, constituído pela película e sumo extraídos das uvas, pode ser inoculado com leveduras que irão proceder à fermentação dos açúcares, frutose e glucose, convertendo-os em álcool etílico e dióxido de carbono. Estas leveduras produzem ainda dióxido de enxofre, que é portanto considerado um conservante natural do vinho. De facto, o dióxido de enxofre evita a proliferação de microrganismos que podem ter um efeito indesejado no produto, tais como bactérias acéticas, responsáveis pela formação de vinagre, e leveduras deteriorantes. O dióxido de enxofre evita ainda processos de oxidação e escurecimento do vinho (Grainger & Tattersall, 2005; Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006a; Jackson, 2008). A maior parte das vezes, a quantidade deste composto

produzido pelas leveduras é insuficiente para conservar eficientemente o vinho, motivo pelo qual se recorre muitas vezes à sua adição.

De modo a obter-se uma fermentação homogénea, é necessário misturar o bagaço, que tem tendência a ir para a superfície (remontagem), com o mosto que fica geralmente na parte inferior dos tanques de fermentação. No fim da fermentação, as uvas são prensadas de modo a libertar o líquido que se encontra ainda retido nos bagos. A seguir à prensagem, pode ocorrer a fermentação maloláctica, mediada por bactérias, e que consiste na conversão de ácido maloláctico em ácido láctico, reduzindo assim a acidez do vinho (Grainger & Tattersall, 2005; Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006a; Jackson, 2008).

Após a vinificação, os vinhos são envelhecidos em barris, geralmente de carvalho, de modo a adquirirem uma maior complexidade tanto a nível de sabor como a nível de odor (Grainger & Tattersall, 2005; Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006a; Jackson, 2008).

Finalmente, o vinho é filtrado ou clarificado, para remover partículas em suspensão e estabilizado, estando então pronto para engarrafamento (Grainger & Tattersall, 2005; Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006a; Jackson, 2008).

1.1.3.2 – Processo de produção do vinho branco

Após o desengace e o esmagamento das uvas, procede-se à prensagem das mesmas, seguida de uma decantação. Esta consiste na eliminação das partes sólidas presentes no mosto por acção da gravidade. A seguir, ocorre uma fermentação alcoólica, idêntica à que ocorre na produção dos vinhos tintos, transformando o mosto em vinho. Após a transfega, onde o vinho é transferido para uma cuba limpa, o vinho é clarificado e pronto para engarrafamento (Grainger & Tattersall, 2005; Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006a; Jackson, 2008).

1.1.3.3 – Processo de produção do vinho rosé

Após o desengace e esmagamento, as uvas podem ser submetidas a duas as linhas de processamento. No primeiro caso, as uvas tintas são sujeitas ao mesmo tratamento aplicado na produção de vinho branco. No segundo caso, as uvas são maceradas e o mosto é fermentado, o vinho pode ou não passar por um estágio de maturação para a seguir ser engarrafado.

1.1.4 – Cor do vinho

A coloração dos vinhos está estreitamente relacionada com a sua composição em pigmentos fenólicos, particularmente as antocianinas. Estes pigmentos apresentam uma variação de cor de acordo com certos parâmetros físico-químicos do meio onde se encontram. Um dos aspectos principais a ter em

conta é o pH do vinho, uma vez que em meio ácido as antocianinas apresentam uma coloração vermelha que se dissipa à medida que sobe o pH, apresentando uma cor azul arroxeada quando o pH é superior a 4 e uma cor amarela quando o pH é neutro ou básico (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006b).

As antocianinas são moléculas pouco estáveis, razão pela qual a sua concentração decresce com o decorrer do tempo. O facto da cor do vinho se manter ao longo do tempo é um indicativo que outras espécies químicas estão envolvidas na manutenção da cor (Packer & Cadenas, 2002; Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006b; Moreno-Arribas & Polo, 2009). Este fenómeno designa-se por copigmentação e envolve reacções entre antocianinas e outros compostos, geralmente fenólicos (Packer & Cadenas, 2002; Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006b; Moreno-Arribas & Polo, 2009). A copigmentação pode ainda apresentar-se sob a forma de dois fenómenos designados por efeitos batocrómico e hiperocrómico. No primeiro caso, existe uma reacção de condensação entre antocianinas e taninos que pode ainda integrar catiões metálicos fazendo com que a coloração do complexo formado apresente uma cor mais arroxeada. Este efeito é, no entanto, minimizado nos vinhos devido à presença de etanol que inibe as ligações em causa. No segundo caso, existe a formação de um complexo antocianina-tanino fazendo com que a coloração da solução se torne levemente mais azulada acompanhada com um aumento da intensidade da cor (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006b).

Ao longo do tempo, ocorrem diferentes processos de condensação originando estruturas com diferentes características cromáticas, apresentando colorações variando entre o roxo e o laranja (Packer & Cadenas, 2002; Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006b; Moreno-Arribas & Polo, 2009). A estabilidade dos pigmentos formados depende de diversos factores como o tipo de molécula formada, o pH, a temperatura, os níveis de oxidação e a luz, fazendo com que cada vinho apresente uma composição específica que evolui de maneira própria ao longo do tempo.

A cor dos vinhos brancos deve-se essencialmente à presença de compostos fenólicos como derivados de quercetina, ácido cafeico e ácido coumárico, que apresentam um máximo de absorvância nos comprimentos de onda entre 310 e 350 nm. A presença de certos taninos e a extensão da sua oxidação pode ainda contribuir para a coloração amarela dos vinhos, monitorizada a um comprimento de onda de 420 nm (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006b).

A Comissão Internationale d'Éclairage (CIE) definiu certos parâmetros para a avaliação da cor nos vinhos. Entre eles destacam-se a intensidade da cor, a tonalidade, a composição da coloração e ainda o brilho dos vinhos tintos (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006b).

A intensidade da cor corresponde à quantidade de cor do vinho tendo em conta a contribuição do amarelo, vermelho e azul à coloração total e é calculada através do somatório das absorvâncias aos comprimentos de onda de 420, 520 e 620 nm (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006b).

A tonalidade é indicativa do desenvolvimento da cor para tons laranja, sendo mais baixa em vinhos novos do que em vinhos envelhecidos e é obtida através da razão entre as absorvâncias medidas aos comprimentos de onda de 420 e 520 nm (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006b).

A composição da coloração avalia a contribuição das três componentes na coloração total e é calculada pela razão entre as absorvâncias medidas aos comprimentos de onda respectivos pela intensidade da cor, valor ao qual se aplica um factor de 100 para apresentar os resultados sob a forma de percentagem (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006b).

O brilho dos vinhos tintos refere-se essencialmente à forma do espectro de absorvância, sendo que um máximo aos 520 nm mais estreito e definido está associado a uma coloração vermelha viva enquanto um máximo aos 520 nm mais achatado e alargado está associado a uma coloração vermelha mais intensa (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006b). O brilho dos vinhos (B) pode ser calculado de acordo com a seguinte fórmula: $B = \left(1 - \frac{A_{420} + A_{620}}{2 \times A_{520}}\right) \times 100$, onde A_{420} , A_{520} e A_{620} são os valores de absorvância medidos aos comprimentos de onda de 420, 520 e 620 nm, respectivamente. Quanto maior for o valor de B, mais dominante é a coloração vermelha do vinho.

1.2 – Actividade antioxidante

O vinho é considerado um alimento funcional pois contém componentes que exercem efeitos benéficos para a saúde do consumidor desde que ingeridos em doses fisiologicamente equilibradas. Um desses efeitos benéficos é a capacidade de neutralização de espécies químicas consideradas oxidantes, ou seja, a actividade antioxidante.

1.2.1 – Composição fenólica do vinho

O vinho possui uma elevada quantidade de compostos com características antioxidantes, a maior parte deles provenientes da uva (Cadenas & Packer, 2002, Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006b; Moreno-Arribas & Polo, 2009). No entanto, os métodos de vinificação aplicados, nomeadamente, o tempo de maturação em barricas de carvalho e a possível adição de sulfitos para conservação do vinho, podem contribuir para a presença de outras substâncias de carácter antioxidante.

Os compostos antioxidantes que se destacam no vinho são os compostos fenólicos, que se caracterizam por possuírem anéis aromáticos e grupos hidroxilo, sendo denominados por fenólicos quando possuem apenas um anel aromático e por polifenólicos quando possuem mais do que um anel aromático (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006b; Moreno-Arribas & Polo, 2009). Os compostos fenólicos podem ainda ser separados em duas categorias: os flavonóides e não-flavonóides (Cadenas & Packer, 2002).

1.2.1.1 – Flavonóides

Os flavonóides são pigmentos de coloração amarela que se caracterizam por um esqueleto comum do tipo C6-C3-C6, consistindo em dois anéis fenólicos unidos por um anel pirano heterocíclico. Esta estrutura (Figura 1.6) pode ocorrer como derivado de um núcleo de 2-fenil cromona por um lado, originando flavonas (a- $R_3 = H$) e flavonóis (a - $R_3 = OH$), e como derivado de um núcleo de 2-fenil cromanona por outro lado, originando flavanonas (b - $R_3 = H$) e flavanonóis (b - $R_3 = OH$) (Cadenas & Packer, 2002; Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006b; Moreno-Arribas & Polo, 2009).

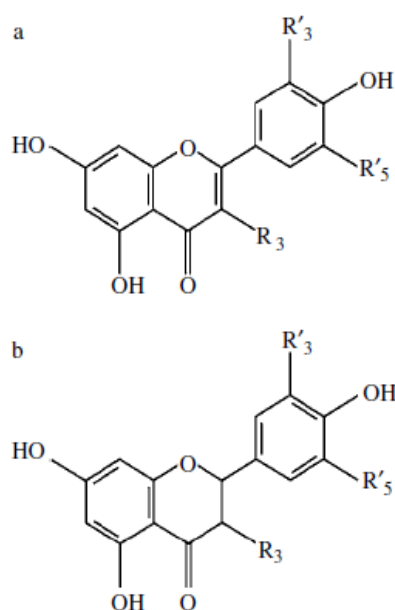


Figura 1.6 – Estrutura de flavonóides (adaptado de Moreno-Arribas & Polo, 2009)

a – Flavona $R_3 = H$; Flavonol $R_3 = OH$; b – Flavanona $R_3 = H$; Flavanonol $R_3 = OH$

Os flavonóides predominantes no vinho são, sem dúvida, os flavonóis. Entre eles destacam-se o campferol, a quercetina e a miricetina (Figura 1.7), sendo que os três compostos se encontram no vinho tinto, mas apenas os dois primeiros se encontram no vinho branco (Moreno-Arribas & Polo, 2009).

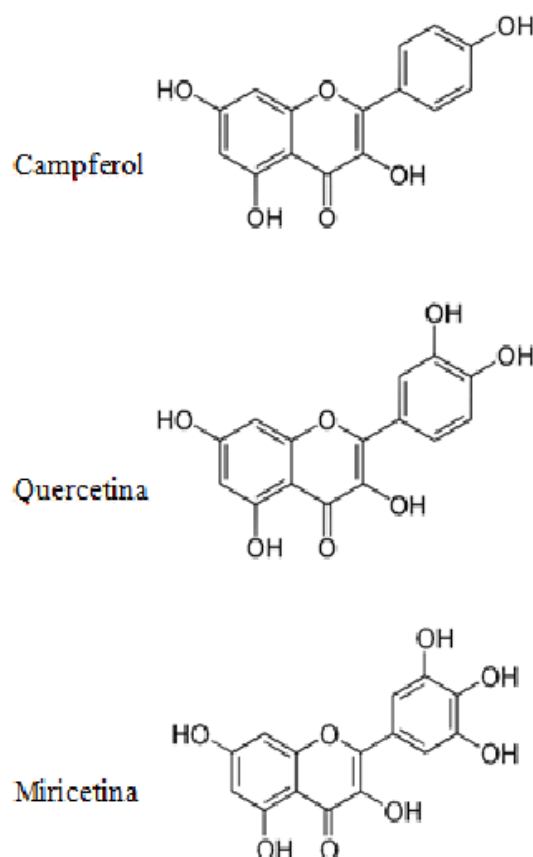


Figura 1.7 – Estruturas de alguns flavonóis presentes no vinho

Entre os flavonóides destacam-se ainda os flavanóis (Figura 1.8) cuja estrutura é idêntica aos flavonóis, com exceção de não possuírem um grupo cetona no anel pirano (Cadenas & Packer, 2002; Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006b; Moreno-Arribas & Polo, 2009). Os flavanóis monoméricos mais importantes no vinho são os isômeros (+)-catequina e (-)-epicatequina, responsáveis por características de acidez. Os flavanóis poliméricos compreendem as proantocianidinas (oligômeros) e os taninos condensados (polímeros), de extrema importância organoléptica uma vez que são responsáveis por qualidades de adstringência do vinho (Moreno-Arribas & Polo, 2009).

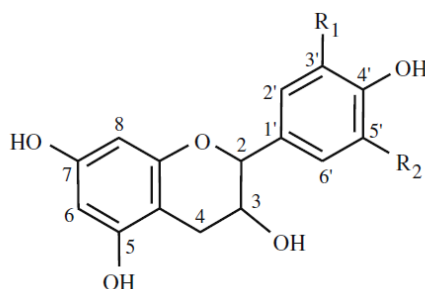


Figura 1.8 – Estrutura química de um flavanol (Moreno-Arribas & Polo, 2009).

As antocianinas são os pigmentos responsáveis pela coloração vermelha e azul das cascas das uvas e também do vinho tinto. Esta coloração deve-se à sua conformação característica, sendo que quando a estrutura é alterada, existe desaparecimento da cor (Moreno-Arribas & Polo, 2009). Nas uvas e nos vinhos, foram identificados cinco tipos de antocianinas correspondentes aos monoglucósidos de cinco antocianidinas principais (Figura 1.9) (delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina) (Cadenas & Packer, 2002; Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006b; Moreno-Arribas & Polo, 2009). As antocianinas ainda reagem com os taninos condensados para originar estruturas conhecidas como taninos pigmentados que participam para a coloração do vinho (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006b; Moreno-Arribas & Polo, 2009).

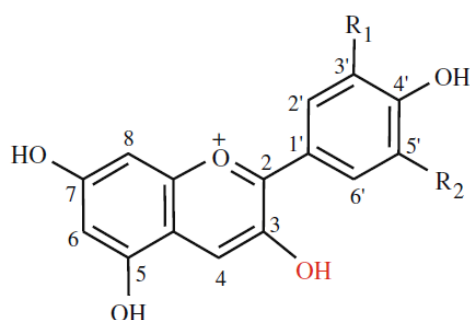


Figura 1.9 – Estrutura química de uma antocianidina ou antocianina aglícona (Moreno-Arribas & Polo, 2009).

1.2.1.2 – Compostos fenólicos não-flavonóides

Os compostos fenólicos não flavonóides no vinho são constituídos essencialmente por ácidos hidroxicinâmicos, ácidos benzóicos, taninos hidrolisáveis e stilbenos (Cadenas & Packer, 2002; Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006b; Moreno-Arribas & Polo, 2009).

Os ácidos hidroxicinâmicos constituem o maior grupo de compostos fenólicos no vinho branco, existindo no entanto em quantidades comparáveis nos vinhos tintos. Os ácidos hidroxicinâmicos encontrados nos vinhos são os ácidos coumárico, cafeico e ferúlico (Cadenas & Packer, 2002; Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006b; Moreno-Arribas & Polo, 2009). São compostos que se oxidam muito rapidamente estando na origem do escurecimento dos vinhos, especialmente indesejado nos vinhos brancos. O escurecimento provém da acção da enzima polifenoloxidase que é libertada durante o esmagamento da uva. Este aspecto é contrabalançado naturalmente na uva pela presença de glutathione que reage rapidamente com o ácido hidroxicinâmico oxidado formando um composto sem cor (Moreno-Arribas & Polo, 2009).

Os ácidos benzóicos aparecem no vinho em menores proporções relativamente aos ácidos hidroxicinâmicos (Figura 1.10). Estes compostos podem existir inicialmente nas uvas ou podem ser produzidos a partir da hidrólise de taninos hidrolisáveis (ésteres de ácido gálico e de ácido elágico) e taninos condensados. Apesar de existirem diferentes tipos de ácidos benzóicos no vinho (tabela), o mais importante é sem dúvida o ácido gálico (Cadenas & Packer, 2002; Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006b; Moreno-Arribas & Polo, 2009).

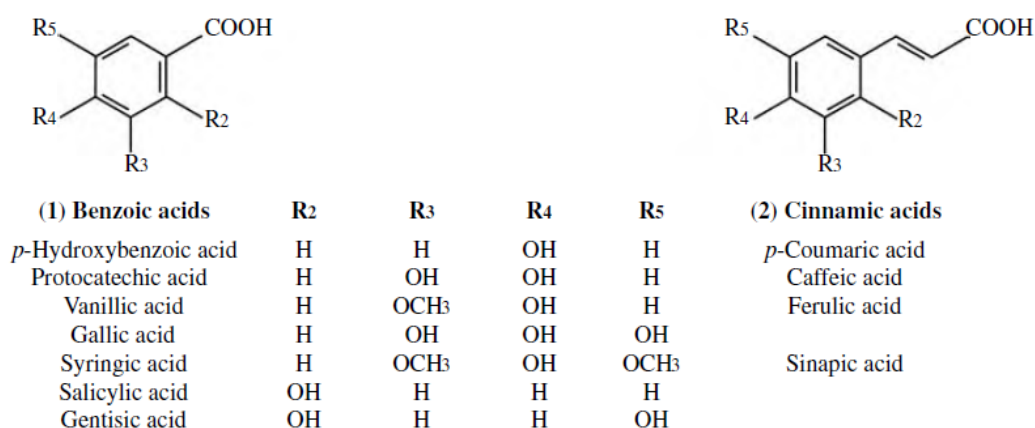


Figura 1.10 – Estrutura química de ácidos benzóicos e cinâmicos (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006b)

Os stilbenos são fitoalexinas produzidas naturalmente nas plantas como uma acção de protecção frente a agressões externas, nomeadamente infecções microbianas e radiações UV (Sandler & Pinder, 2003). Estes compostos são transferidos para o mosto e vinho durante o processo de vinificação, e têm particular relevância nas propriedades nutracêuticas do vinho devido ao seu potencial antioxidante, anticarcinogénico e antimutagénico (Sander & Pinder, 2003; Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006b; Moreno-Arribas & Polo, 2009).

Estes compostos possuem uma estrutura química característica que reside em dois anéis benzénicos unidos por uma cadeia etano ou etileno. O stilbeno de maior relevância no vinho é o trihidroxi-3.5.4'-stilbeno, ou resveratrol (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006b; Moreno-Arribas & Polo, 2009). Este composto é produzido na pele das uvas e transferido para o vinho no momento da fermentação do mosto. O resveratrol existe sob a forma de dois isómeros (conformações *cis*- e *trans*-), ou ainda nas formas livre ou como o derivado glucósido (trans-resveratrol-3-O-glicosídeo). A reacção de isomerização de trans-resveratrol a cis-resveratrol ocorre na presença de luz (Cadenas & Packer, 2002; Moreno-Arribas & Polo, 2009).

O isómero mais estudado é o trans-resveratrol (Figura 1.11), tendo sido determinada a sua eficiência antioxidante no vinho. De facto, trata-se de um composto com potencial para formar complexos com

iões cobre e para sequestrar radicais superóxido e peróxido impedindo assim a peroxidação lipídica (Sandler & Pinder, 2003). Os efeitos protectores do resveratrol foram estudados *in vitro* bem como *in vivo*, tendo sido encontradas evidências da sua capacidade para inibir e prevenir a formação de ROS, proteger o material genético de oxidações e, consequentemente, poder prevenir potenciais situações de cancro assim como de doenças cardiovasculares (Sandler & Pinder, 2003).

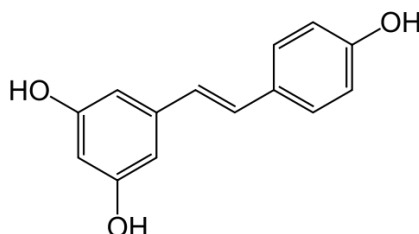


Figura 1.11 – Estrutura química do trans-resveratrol

1.2.1.3 – Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica cromatográfica que permite separar os compostos presentes numa amostra de acordo com a sua estrutura química, nomeadamente o seu peso molecular e sua polaridade, bem como determinar a sua concentração (Mark, 2003; Kazakevich & Lobrutto, 2007; McMaster, 2007).

Os cinco componentes principais desta técnica são eluição, o modo de injeção da amostra, as fases estacionária e móvel, o tipo de detector utilizado e ainda a análise dos dados adquiridos (Mark, 2003; Kazakevich & Lobrutto, 2007; McMaster, 2007).

A eluição dos analitos pela fase móvel é realizada mediante a utilização de uma bomba que se encarrega de fazer passar o eluente de maneira consistente e reproduzível através da coluna cromatográfica com determinados fluxo e pressão (Mark, 2003; Kazakevich & Lobrutto, 2007; McMaster, 2007).

O volume de injeção deve ser o menor possível, sendo no entanto condicionado por factores externos como as dimensões da coluna e a sensibilidade do detector utilizados (Mark, 2003; Kazakevich & Lobrutto, 2007; McMaster, 2007).

O HPLC de fase reversa utiliza uma fase estacionária, constituída por uma coluna cromatográfica com características apolares (Mark, 2003; Kazakevich & Lobrutto, 2007; McMaster, 2007). A selectividade, capacidade e eficiência das colunas depende do material que as constitui. Por exemplo, uma coluna do tipo C18 consiste num empacotamento de esferas de sílica à superfície das quais se

encontram ligadas cadeias poliméricas de hidrocarboneto as quais vão adsorver, com maior ou menor afinidade, os compostos presentes na amostra (Mark, 2003; Kazakevich & Lobrutto, 2007; McMaster, 2007). As colunas caracterizam-se pelas suas dimensões (comprimento, diâmetro e diâmetro dos poros) e pela sua composição (número e tipo de grupos funcionais das cadeias). A fase móvel é composta por solventes ou eluentes, com características polares (geralmente água, metanol ou acetonitrilo) que atravessam a coluna permitindo a eluição dos compostos através da mesma. A eluição pode ser do tipo isocrático ou de gradiente, sendo que no primeiro caso, a composição dos eluentes não varia no decurso da corrida cromatográfica enquanto no segundo caso, a composição dos eluentes é variável (Mark, 2003; Kazakevich & Lobrutto, 2007; McMaster, 2007). A eluição em gradiente permite variar a polaridade da fase móvel ao longo do tempo melhorando a separação dos compostos e portanto a resolução dos cromatogramas obtidos (Mark, 2003; Kazakevich & Lobrutto, 2007; McMaster, 2007).

À saída da coluna, os compostos separados são detectados por um determinado tipo de sensor que produz um sinal eléctrico com uma intensidade proporcional à concentração dos analitos. O resultado será um cromatograma onde cada pico corresponderá a um dos analitos eluídos, sendo caracterizados pelo tempo de retenção, ou seja pelo tempo decorrido entre a injeção da amostra na coluna e a detecção do analito eluído por parte do detector (Mark, 2003; Kazakevich & Lobrutto, 2007; McMaster, 2007). Os detectores utilizados em HPLC podem ser universais ou mássicos, ou seja, detectam qualquer composto eluído da coluna, ou podem ser selectivos, ou seja, detectam apenas compostos com características estruturais e físico-químicas específicas.

O detector de fotodíodos (DAD – Diode-Array Detector) permite a absorção de luz no espectro UV-VIS (190 – 700 nm), tendo como grande vantagem a possibilidade de monitorizar qualquer comprimento de onda (dentro dos limites UV-VIS) num só cromatograma. Desta forma, existe a informação adicional do espectro de absorção de cada um dos analitos que contribui para a sua identificação juntamente com o tempo de retenção (Mark, 2003; Kazakevich & Lobrutto, 2007; McMaster, 2007).

O resultado de uma injeção em HPLC é um cromatograma, onde aparecem diferentes picos, com um tempo de retenção particular e um espectro de absorção próprio, correspondentes a cada um dos analitos. A análise dos cromatogramas consiste não só na identificação tentativa dos compostos eluídos, por comparação com padrões analisados nas mesmas condições, mas também na quantificação dos compostos presentes na amostra injectada. De facto, a área correspondente a cada pico é proporcional à concentração do analito na amostra, pelo que, a construção de rectas de calibração utilizando padrões adequados permite estimar as concentrações dos compostos presentes nas amostras. (Mark, 2003; Kazakevich & Lobrutto, 2007; McMaster, 2007).

1.2.2 – Radicais livres e *stress* oxidativo

A respiração celular é um dos mecanismos essenciais à manutenção e funcionamento do organismo humano. Para produzir elevadas quantidades de adenosina-5-trifosfato (ATP), a moeda energética do organismo, ocorre a transferência de electrões para o oxigénio através do processo de fosforilação oxidativa (Gaté, *et al.*, 1999; Wu & Cederbaum, 2003; Limón-Pacheco & Gonsébat, 2009; Edeas *et al.*, 2010; Burton & Jauniaux, 2011; Halliwell, 2011). Alguns dos compostos gerados durante esta reacção são denominados espécies reactivas de oxigénio (ROS), entre elas os radicais hidróxilo, peróxido, alcóxido e superóxido, o peróxido de hidrogénio, o oxigénio e o ácido hipocloroso (Gaté, *et al.*, 1999; Wu & Cederbaum, 2003; Scheibmeir, *et al.*, 2005; Valko, *et al.*, 2006; Bargagli, *et al.*, 2009; Limón-Pacheco & Gonsébat, 2009; Burton & Jauniaux, 2011; Halliwell, 2011), e espécies reactivas de azoto (RNS), entre elas o óxido nítrico, nitritos, nitratos, peroxinitritos, óxido nitroso e ácido nitroso (Gaté, *et al.*, 1999; Fredstrom, 2002; Valko, *et al.*, 2006; Bargagli, *et al.*, 2009).

Os radicais livres são átomos, moléculas ou iões altamente instáveis devido à sua estrutura atómica ou molecular, na medida em que possuem electrões desemparelhados (Wu & Cederbaum, 2003; Scheibmeir, *et al.*, 2005). Este tipo de compostos apresenta grande tendência para capturar um electrão de outra espécie química de modo a recuperar estabilidade. Neste processo, a molécula vizinha torna-se ela própria um radical livre, provocando uma reacção em cadeia que, no caso de não ser interrompida, pode provocar alterações celulares associadas a patologias como o cancro, desordens neurológicas e diabetes, entre outras (Wu & Cederbaum, 2003; Scheibmeir, *et al.*, 2005; Valko, *et al.*, 2006; Halliwell, 2011).

Os radicais livres ocorrem no organismo humano por exposição a irradiação de luz UV, raios X e raios γ , por exposição a agentes poluentes ambientais por inalação ou ingestão, como produtos de reacções catalisadas por metais, como produtos de neutrófilos e macrófagos durante processos de inflamação e como subprodutos de reacções de transporte de electrões catalisados nas mitocôndrias entre outros mecanismos (Scheibmeir, *et al.*, 2005; Limón-Pacheco & Gonsébat, 2009).

Os agentes antioxidantes revelam ser o principal mecanismo de defesa frente à acção dos radicais livres no organismo humano, existindo um esforço constante para a manutenção de um equilíbrio entre ambos. Quando os radicais livres se encontram em excesso relativamente à quantidade de antioxidantes presentes, o organismo entra em estado de *stress* oxidativo, que persistindo pode dar origem a uma série de patologias (Wu & Cederbaum, 2003; Scheibmeir, *et al.*, 2005; Valko, *et al.*, 2006; Bargagli, *et al.*, 2009).

O organismo defende-se deste ataque oxidativo segundo mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos (Gaté, *et al.*, 1999; Wu & Cederbaum, 2003; Valko, *et al.*, 2006; Burton & Jauniaux, 2011).

O mecanismo antioxidante enzimático baseia-se na acção de enzimas que possuem metais no seu centro activo com múltiplas valências. Desta forma, é possível a neutralização de radicais livres por transferência electrónica sem que as próprias enzimas se tornem espécies radicalares. Entre estas enzimas destacam-se a superóxido dismutase, a catalase e a glutathiona peroxidase (Figura 1.12) (Gaté, *et al.*, 1999; Wu & Cederbaum, 2003; Scheibmeir, *et al.*, 2005; Valko, *et al.*, 2006; Bargagli, *et al.*, 2009; Limón-Pacheco & Gonsebatt, 2009; Burton & Jauniaux, 2011).

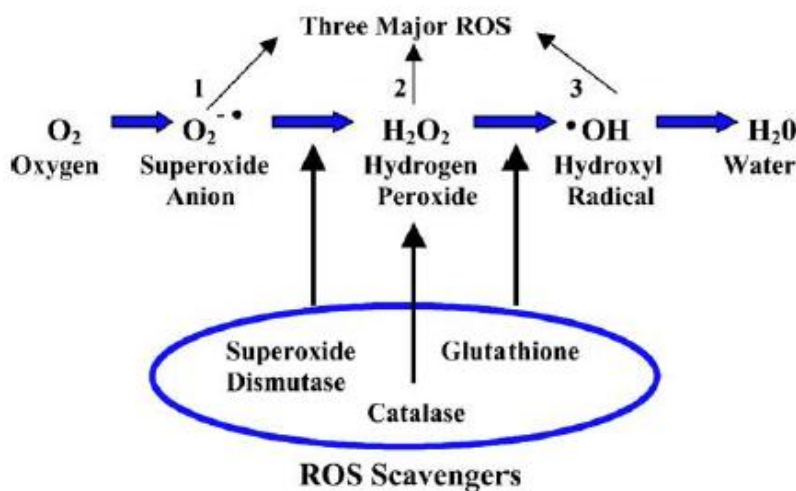


Figura 1.12 – Processo de formação de espécies reactivas de oxigénio (Scheibmeir, *et al.*, 2005)

O mecanismo antioxidante não enzimático envolve moléculas como as vitaminas A, C e E, moléculas tióis como a glutathiona, a tiorredoxina e o ácido lipóico, e ainda carotenóides e flavonóides (Figura 1.13) (Gaté, *et al.*, 1999; Thomas, 2000; Fredstrom, 2002; Wu & Cederbaum, 2003; Valko, *et al.*, 2006; Burton & Jauniaux, 2011).

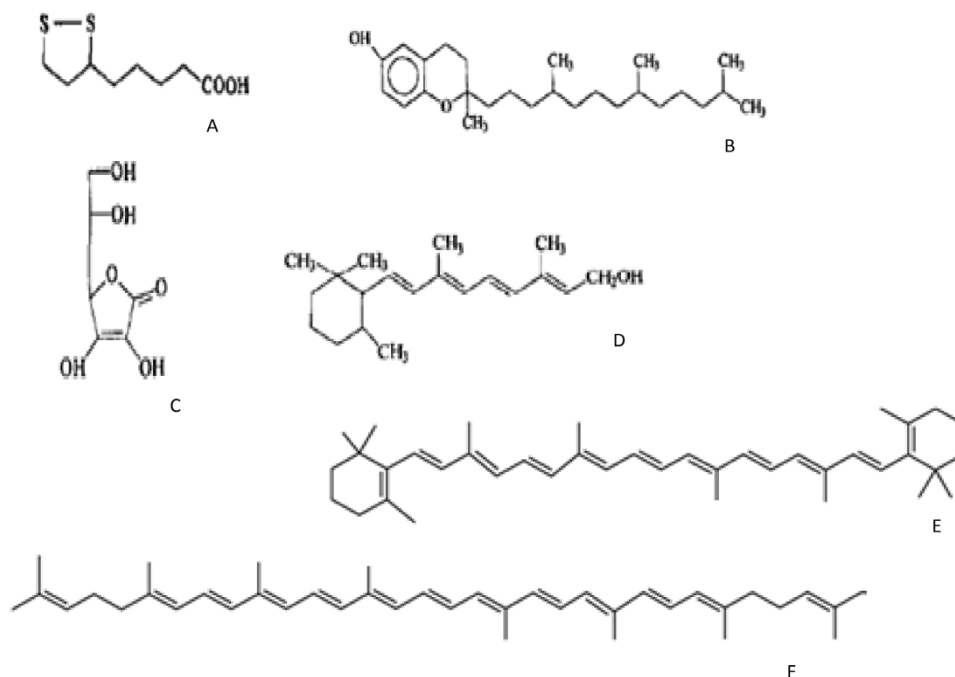


Figura 1.13 – Estrutura de alguns compostos antioxidantes

A – Ácido lipóico; B – α -Tocoferol (Vitamina E); C – Ácido ascórbico (Vitamina C); D – Retinol (Vitamina A); E – β -Caroteno; F – Licopeno

1.2.3 – Determinação da actividade antioxidante

Existem dois mecanismos pelos quais os antioxidantes conseguem neutralizar os radicais livres. O primeiro mecanismo baseia-se na neutralização do radical livre mediante a doação de um átomo de hidrogénio (um protão e um electrão). O segundo baseia-se no potencial que tem o agente antioxidante em ceder um electrão de modo a reduzir qualquer outro composto, nomeadamente metais, grupos carbonilo ou até radicais (Huang, *et al.*, 2005; Prior, *et al.*, 2005; Apak, *et al.*, 2007).

A determinação da actividade antioxidante de uma amostra pode ser realizada através de ensaios seguindo o primeiro ou o segundo.

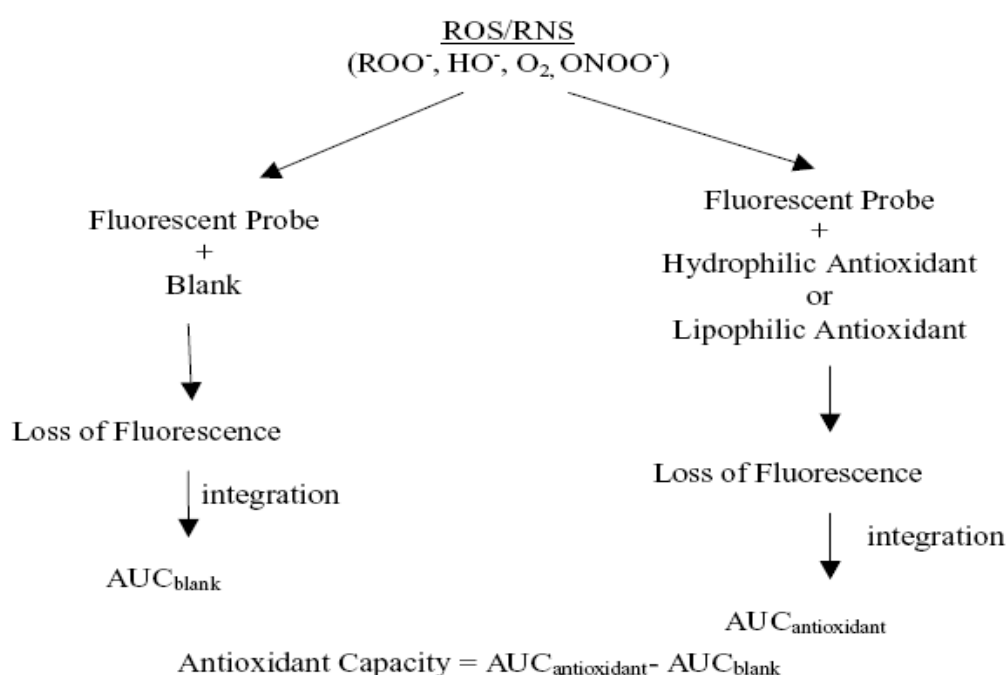
1.2.3.1 – Ensaios baseados na doação de um átomo de hidrogénio

1.2.3.1.1 – ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

O ensaio de ORAC permite determinar a capacidade de sequestração de radicais peróxido por parte de compostos antioxidantes. Neste ensaio os radicais peróxido em excesso reagem com uma sonda fluorescente para formar um produto não fluorescente. Os antioxidantes presentes na amostra vão

neutralizar os radicais livres, fazendo com que se formem menos produtos não fluorescentes. A capacidade antioxidante pode então ser determinada através da diminuição da taxa de fluorescência ao longo do tempo associada à produção de produtos não fluorescentes resultantes da neutralização dos radicais livres (Wang, *et al.*, 2004; Huang, *et al.*, 2005; Prior, *et al.*, 2005; Apak, *et al.*, 2007; Kohri, *et al.*, 2009). Desta forma, quanto mais tempo demorar a diminuir a fluorescência do meio reaccional, maior será a capacidade antioxidante da amostra testada (Figura 1.14).

Este ensaio é repetido, substituindo a amostra por concentrações diferentes de um padrão antioxidante, o trolox, de modo a obter rectas de calibração. Os resultados deste ensaio para as amostras são apresentados sob a forma de equivalentes de trolox.



AUC= area under the curve OH⁻= Hydroxide ion ONOO⁻= Peroxynitrite

Figura 1.14 – Princípio do ensaio ORAC

1.2.3.1.2 – TRAP (Radical-trapping antioxidant parameter)

Os radicais peróxido produzidos a partir da degradação do dicloridrato de 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) (AAPH) oxidam moléculas de luminol, dando origem a radicais livres de luminol que emitem luz. A presença de antioxidantes no meio reaccional impede até certo ponto a produção destes radicais, retardando a emissão de luz. Desta forma, o tempo decorrido entre a adição de uma substância antioxidante, nomeadamente a amostra a testar, e a emissão de luz por parte dos radicais de

luminol é indicativo da capacidade antioxidante desta substância (Ghiselli, *et al.*, 1994; Huang, *et al.*, 2005; Prior, *et al.*, 2005; Apak, *et al.*, 2007).

Ao longo do tempo, têm existido variações deste método a nível da sonda utilizada, tendo o luminol sido substituído por uma proteína com características de fluorescência, a R-Ficoeritrina.

1.2.3.1.3 – TOSC (Total Oxidant Scavenging Capacity)

Este ensaio permite quantificar a capacidade antioxidante de uma determinada amostra frente a três agentes oxidantes específicos, os radicais hidroxilo (HO^\bullet), radicais peróxilo (ROO^\bullet) e o anião peroxinitrito (ONOO^-).

O substrato, ácido α -ceto- γ -metiolbutírico (KMBA), quando oxidado por estes radicais forma etileno. Na presença de substâncias antioxidantes, esta reacção é atrasada, assim como a formação de etileno. Ao analisar o espaço de cabeça da célula reaccional por cromatografia gasosa, é possível monitorizar a formação de etileno. Desta forma, a capacidade antioxidante da amostra é quantificada de acordo com a sua capacidade de inibir a formação de etileno, quando comparada com uma reacção controlo (Prior, *et al.*, 2005).

1.2.3.1.4 – Quimioluminescência

Como o próprio nome indica, as reacções de quimioluminescência baseiam-se na formação de produtos que emitem luz. Um composto marcador é oxidado por radicais livres dando origem a produtos num estado de energia elevado; estes produtos têm a capacidade de transferir parte da sua energia em excesso para fotões e regressar assim a um estado de energia mais baixo e portanto mais estável. O agente marcador geralmente utilizado é o luminol, apesar da crescente popularidade de utilização de proteínas bioluminescentes. A presença de agentes antioxidantes no meio reaccional vai inibir a oxidação dos marcadores, inibindo por sua vez a produção de luminescência. Uma vez esgotados os antioxidantes, os radicais vão oxidar os marcadores. Assim, o poder antioxidante de uma amostra é tanto maior quanto mais tempo decorrer até surgir a emissão de luminescência (Prior, *et al.*, 2005).

1.2.3.1.5 – Fotoquimioluminescência

Um ensaio de fotoquimioluminescência pode ser efectuado num aparelho dedicado, comercializado pela empresa Analytik Jena AG (Jena, Alemanha) e denominado PHOTOCHEM.

Na célula reaccional, ocorre a excitação de um fotosensibilizador, o luminol, dando origem a radicais de luminol com propriedades quimioluminescentes e radicais de anião superóxido. Os antioxidantes

presentes na amostra vão neutralizar os radicais livres, inibindo a emissão de luminescência. Uma vez esgotados os antioxidantes, os radicais remanescentes vão emitir luz que é detectada pelo equipamento (Prior, *et al.*, 2005; Yang, *et al.*, 2009).

O sistema PHOTOCHEM vem ainda equipado com duas modalidades de ensaio que servem para analisar compostos hidrofílicos (kit ACW) e compostos lipofílicos (kit ACL).

No caso do ensaio hidrofílico, a capacidade antioxidante da amostra é obtida através do tempo (L) decorrido desde o início do ensaio até a emissão de luminescência. Isto é, $L = L_0 - L_1$, onde L_0 e L_1 correspondem aos parâmetros respectivos do branco e da amostra.

No caso do ensaio lipofílico, a capacidade antioxidante da amostra é obtida através da quantificação do grau de inibição da luminescência (I). Isto é, $I = 1 - S / S_0$, onde S_0 representa o integral correspondente á curva do branco e S representa o integral correspondente á curva da amostra.

Uma das maiores vantagens deste sistema é a sensibilidade do mesmo, uma vez ser possível a quantificação de capacidades antioxidantes extremamente baixas de amostras diluídas (a partir de 0,5 mM de equivalentes de ácido ascórbico ou trolox).

Uma das desvantagens deste sistema reside no facto de apenas ser possível a leitura de uma amostra de cada vez, tornando o estudo de um elevado número de amostras demorado. Este aspecto torna-se problemático sobretudo devido ao facto do tempo de vida do luminol ser bastante curto (entre 4 a 8 horas).

Outra desvantagem prende-se com a presença de estruturas moleculares de configuração volumosa na amostra podendo provocar fenómenos de difracção ou absorção de luminescência interferindo na quantificação da capacidade antioxidante da amostra.

1.2.3.1.6 – Branqueamento de β -caroteno

Os carotenóides são compostos corados que podem sofrer descoloração quando oxidados, nomeadamente por autooxidação, por luz ou calor ou ainda por radicais peróxilo. Ao existirem antioxidantes no meio reaccional, os radicais livres vão oxidar estes compostos em vez dos carotenóides verificando-se portanto uma menor descoloração (Huang, *et al.*, 2005; Prior, *et al.*, 2005).

Os carotenóides mais utilizados neste teste são o β -caroteno e a crócina, cuja descoloração pode ser monitorizada a um comprimento de onda de 470 nm e 443 nm, respectivamente.

No entanto, a descoloração da crócina ocorre apenas por oxidação mediada por radicais peróxilo enquanto o β -caroteno pode ser oxidado por diferentes vias. Desta forma, a crócina torna-se num alvo de oxidação mais específico, sendo os resultados obtidos de mais fácil interpretação, isto é, a oxidação não se deve a fenómenos de autooxidação nem de indução por luz ou calor, mas apenas por reacção com radicais peróxilo. O β -caroteno continua a ser o alvo mais utilizado devido ao facto de ser comercializado enquanto a crócina apenas pode ser obtido por extracção das flores de açafraão ou gardénia.

1.2.3.1.7 – Oxidação de LDL

Este método induz artificialmente a autooxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) por um composto iniciador, geralmente Cu(II) ou AAPH. A peroxidação dos componentes lipídicos origina dienos conjugados ou hidroperóxidos lipídicos cuja formação pode ser monitorizada através das leituras de absorvância da amostra a um comprimento de onda de 234 nm.

A reacção de autooxidação é lenta na ausência de um iniciador, e acelera na presença do mesmo. Ao juntar substâncias antioxidantes, nomeadamente a amostra a analisar, no meio reaccional, a velocidade da reacção de oxidação diminui. Uma vez esgotadas as substâncias antioxidantes, a velocidade da reacção volta a aumentar. O tempo de inibição da reacção é tanto maior quanto maior for a capacidade antioxidante da amostra analisada (Huang, *et al.*, 2005; Prior, *et al.*, 2005).

1.2.3.1.8 – DPPH[•] (radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

O ensaio de DPPH mede a capacidade de uma substância em neutralizar os radicais DPPH[•]. Este composto constitui um dos poucos radicais azotados orgânicos estáveis, que pode ser comercializado como tal, eliminando a necessidade de ser gerado antes de um ensaio de actividade antioxidante.

Em solução metanólica, o DPPH[•] apresenta uma forte coloração roxa, que apresenta um máximo de absorvância entre 515 e 520 nm. Ao colocar compostos antioxidantes na amostra, estes vão neutralizar o radical doando um átomo de hidrogénio e convertendo o DPPH[•] num derivado incolor. A perda de cor pode ser monitorizada ao longo do tempo por espectrofotometria e está correlacionada com a capacidade antiradicalar da amostra testada (Huang, *et al.*, 2005; Prior, *et al.*, 2005; Apak, *et al.*, 2007; Tirzitis & Bartosz, 2010).

A capacidade antiradicalar da amostra pode ser apresentada sob a forma de percentagem de inibição do radical (I), após um determinado tempo de reacção. Isto é, $I = 100 \times \frac{Ab - Aa}{Ab}$, onde Ab é o valor de absorvância do branco e Aa é o valor de absorvância da amostra.

Ao substituir a amostra por quantidades conhecidas de um padrão, é possível calcular as percentagens de inibição do radical por parte desse padrão de modo a construir rectas de calibração, e apresentar os resultados, não sob a forma de percentagem de inibição, mas sob a forma de equivalentes desse padrão.

Uma das desvantagens deste método é o facto de utilizar um radical sintético, e portanto sem grande relevância biológica. No entanto, trata-se de um ensaio simples, pouco dispendioso e rápido, e por isso largamente difundido no âmbito da caracterização da actividade antioxidante de diversas matrizes.

1.2.3.1.9 – TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity)

Este ensaio permite a quantificação da actividade antioxidante de uma amostra através da sua capacidade em reduzir radicais catiões ABTS^{•+}.

Ao juntar na mistura reaccional persulfato de potássio a ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3 - etilbenzotiazolino-6-sulfónico), este último é oxidado ao catião ABTS^{•+}, que possui uma coloração azul escuro com máximos de absorvância aos comprimentos de onda 415 nm, 645 nm, 734 nm e 815 nm. Ao juntar substâncias antioxidantes à mistura, o catião ABTS^{•+} é reduzido a ABTS, fazendo com que se dê a descoloração da solução inicial. Uma vez esgotados os antioxidantes no meio reaccional, o ABTS volta a ser oxidado a ABTS^{•+}, regressando a coloração azul da solução.

A extensão da descoloração que ocorre durante um determinado período de tempo, geralmente monitorizada a 415 nm, vai depender directamente da capacidade antioxidante da amostra (Re, *et al.*, 1998; Wang, *et al.*, 2004; Huang, *et al.*, 2005; Prior, *et al.*, 2005; Apak, *et al.*, 2007). Ao aplicar as mesmas condições reaccionais a um padrão, é possível apresentar a capacidade antioxidante da amostra sob a forma de equivalentes desse padrão.

Ao considerar os radicais sintéticos, ou seja o DPPH[•] e o ABTS^{•+}, a transferência do protão pode ser imediata ou não. No primeiro caso, ocorre a homólise do antioxidante protonado originando um radical de hidrogénio que irá reagir com o radical, dando origem ao radical protonado, ou seja neutralizado, e a produtos derivados do antioxidante que reagiu. No segundo caso, existe uma dissociação do antioxidante protonado, originando, em solução, um protão e o antioxidante desprotonado. Este antioxidante desprotonado reage em seguida com o radical, surgindo produtos derivados do antioxidante que reagiu, juntamente com o radical desprotonado. Finalmente, o radical desprotonado reage com o protão que tinha sido libertado previamente, dando origem ao radical protonado.

1.2.3.2 – Ensaios baseados na neutralização mediante cedência de electrão

1.2.3.2.1 – FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

O método de FRAP baseia-se na redução, em meio ácido, de um complexo férrico de TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) a um complexo ferroso de TPTZ com uma forte coloração azul escura. Quanto maior for a capacidade antioxidante da amostra, maior será a produção do complexo ferroso de TPTZ, podendo ser monitorizado através da leitura da absorvância a um comprimento de onda de 593 nm (Figura 1.15) (Huang, *et al.*, 2005; Prior, *et al.*, 2005; Apak, *et al.*, 2007).

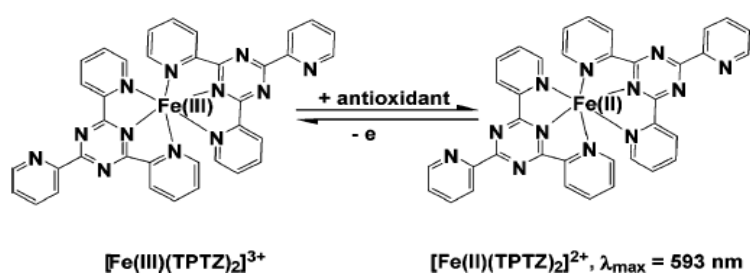


Figura 1.15 – Princípio de poder de redução férrica (Huang, *et al.*, 2005)

A construção de rectas de calibração é possível através da substituição da amostra por concentrações conhecidas de padrões contendo ferro no estado reduzido, nomeadamente sulfato ferroso (FeSO_4) ou padrões de um antioxidante sendo a capacidade redutora expressa em equivalentes de iões ferrosos ou equivalentes desse composto antioxidante.

Uma das limitações desta técnica consiste no facto de apenas avaliar a capacidade da amostra em reduzir iões férricos e não a sua capacidade em neutralizar radicais livres ou outras espécies antioxidantes. No entanto, trata-se de um ensaio simples, reproduzível e pouco dispendioso, quando comparado com outros métodos de avaliação da actividade antioxidante.

1.2.3.2.2 – CUPRAC (Copper reduction assay)

O ensaio de CUPRAC baseia-se na redução de Cu(II) a Cu(I) , que por sua vez vai formar um complexo com um agente cromogénico. Os agentes cromogénicos mais utilizados são a batocuproína (2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina) e a neocuproína (2,9-dimetil-1,10-fenantrolina) que absorvem a um comprimento de onda de 490 nm e 450 nm, respectivamente. Quanto mais elevada for a capacidade antioxidante da amostra, maior é a taxa de redução do Cu(II) a Cu(I) , reflectindo-se num

aumento da absorvância no comprimento de onda de absorção máxima do agente cromogénico utilizado (Huang, *et al.*, 2005; Prior, *et al.*, 2005; Apak, *et al.*, 2007).

A realização de rectas de calibração permite a quantificação e apresentação da capacidade antioxidante das amostras sob a forma de equivalentes do padrão seleccionado.

A relevância deste teste deve-se ao facto de o cobre ser também um ião metálico de ocorrência biológica e com efeitos pro-oxidantes na sua forma cúprica livre.

1.2.3.2.3 – Folin-Ciocalteu

O ensaio de Folin-Ciocalteu, também conhecido como o método dos fenóis totais, baseia-se na quantificação da actividade antioxidante através da quantificação dos compostos fenólicos presentes na amostra a testar.

O método baseia-se na redução de um complexo de molibdénio-tungstato-fósforo, em meio básico, por parte dos compostos fenólicos presentes na amostra. A monitorização da reacção é realizada por colorimetria uma vez que o complexo reduzido apresenta uma coloração azul intensa e absorvância máxima ao comprimento de onda de 765 nm. Desta forma, quanto maior for a quantidade de compostos fenólicos presentes na amostra, maior será a absorvância a este comprimento de onda (Huang, *et al.*, 2005; Prior, *et al.*, 2005; Apak, *et al.*, 2007).

A realização de rectas de calibração permite expressar o teor de compostos fenólicos totais na amostra em equivalentes do padrão escolhido, sendo o mais utilizado o ácido gálico.

1.3 – Objectivos

O vinho constitui uma parte importante dos hábitos alimentares do povo mediterrânico e, quando ingerido com moderação, apresenta características nutracêuticas devido essencialmente à sua composição em agentes antioxidantes.

Em primeiro lugar, procura-se a determinação da capacidade antioxidante de 88 vinhos portugueses, 63 tintos, 21 brancos e 4 rosés, de três regiões vitivinícolas portuguesas, sendo estas Lisboa, Tejo e Península de Setúbal. Os ensaios realizados englobam a determinação do poder de redução férrica, através do ensaio de FRAP, da actividade antiradicalar, mediante os ensaios de DPPH e fotoquimioluminescência e a determinação da composição total em fenólicos utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu.

Em segundo lugar, procura-se identificar e quantificar compostos pertencentes aos principais grupos de fenólicos do vinho, nomeadamente o ácido gálico representando os ácidos benzóicos, o ácido

cafeico e o ácido ferúlico representando os ácidos hidroxicinâmicos, o trans-resveratrol representando os stilbenos e a quercetina representando os flavonóides.

Em terceiro lugar, são avaliados parâmetros inerentes às características de cor dos vinhos tintos, nomeadamente a sua intensidade total, o seu brilho e tonalidade e a sua composição em percentagem de amarelo, vermelho e azul.

Um dos objectivos deste trabalho é contribuir para uma caracterização dos vinhos portugueses em termos da sua actividade antioxidante global, assim como da sua composição em determinados fenólicos e das suas características de cor, e compará-las com estudos publicados, tanto a nível nacional, como a nível internacional.

Outro objectivo baseia-se na possibilidade de existirem correlações entre a actividade antioxidante do vinho, composição em determinados fenólicos e características de cor com parâmetros associados à região de produção e determinar se existem castas que afectem directamente estes aspectos.

2 – Materiais e Métodos

2.1 – Amostragem

Foram analisados um total de 88 vinhos portugueses, das regiões vitivinícolas de Lisboa, Tejo e Península de Setúbal. Este conjunto de 88 vinhos incluiu 63 vinhos tintos, 21 vinhos brancos e 4 vinhos rosés. Na Tabela 2.1 constam as informações disponíveis acerca dos vinhos analisados.

Tabela 2.1 – Amostragem

Código	Região	Casta(s)	Ano	Tipo de vinho
JR01	Tejo	Touriga Nacional	2010	Tinto
JR02	Tejo	Merlot	2010	Tinto
JR03	Tejo	Cabernet Sauvignon	2010	Tinto
JR04	Tejo	Alicante Bouschet	2010	Tinto
		Cabernet Sauvignon		
		Touriga Nacional		
		Aragonez		
		Syrah		
JR05	Península de Setúbal	Castelão	2009	Tinto
		Aragonez		
JR06	Península de Setúbal	Merlot	2008	Tinto
JR07	Península de Setúbal	Castelão	2008	Tinto
JR08	Tejo	Aragonez	2007	Tinto
		Cabernet Sauvignon		
		Alicante Bouschet		
		Touriga Nacional		
JR09	Península de Setúbal	Castelão	2009	Tinto
JR10	Península de Setúbal	Touriga Nacional	2008	Tinto
		Castelão		
		Aragonez		
JR11	Lisboa	Touriga Nacional	2007	Tinto
		Alicante Bouschet		
		Cabernet Sauvignon		
JR12	Península de Setúbal	Castelão	2008	Tinto
JR13	Península de Setúbal	Castelão	2009	Tinto
JR14	Lisboa	Touriga Nacional	2008	Tinto
		Cabernet Sauvignon		
		Petit Verdot		
JR15	Península de Setúbal	Castelão	2008	Tinto
		Touriga Nacional		
		Cabernet Sauvignon		

Tabela 2.1 (cont.1) – Amostragem

Código	Região	Casta(s)	Ano	Tipo de vinho
JR16	Península de Setúbal	Aragonez	2010	Tinto
		Castelão		
		Syrah		
JR17	Península de Setúbal	Aragonez	2010	Tinto
		Castelão		
		Syrah		
JR18	Lisboa	Castelão	2008	Tinto
		Trincadeira		
		Aragonez		
		Cabernet Sauvignon		
JR19	Península de Setúbal	Castelão	2008	Tinto
JR20	Península de Setúbal	Cabernet Sauvignon	2009	Tinto
		Castelão		
JR21	Tejo	Fernão Pires	2010	Branco
JR22	Tejo	Chardonnay	2010	Branco
JR23	Tejo	Sauvignon	2010	Branco
JR24	Península de Setúbal	Arinto	2009	Branco
		Chardonnay		
		Antão Vaz		
JR25	Lisboa	Arinto	2008	Branco
JR26	Península de Setúbal	Fernão Pires	2009	Branco
JR27	Lisboa	Arinto	2010	Branco
		Fernão Pires		
		Vital		
JR28	Lisboa	Arinto	2010	Branco
JR29	Lisboa	Sauvignon	2010	Branco
JR30	Lisboa	Chardonnay	2010	Branco
JR31	Lisboa	Chardonnay	2010	Branco
JR32	Lisboa	Fernão Pires	2010	Branco
		Arinto		
JR33	Lisboa	Arinto	2010	Branco
		Chardonnay		
JR34	Lisboa	Chardonnay	2008	Branco
JR35	Lisboa	Fernão Pires	2010	Branco
JR36	Lisboa	Sauvignon	2009	Branco
JR37	Lisboa	Arinto	2008	Branco
JR38	Lisboa	Arinto	2010	Branco
JR39	Lisboa	Arinto	2008	Branco
		Fernão Pires		
JR40	Lisboa	Arinto	2007	Branco
JR41	Lisboa	Arinto	2009	Branco

Tabela 2.1 (cont.2) – Amostragem

Código	Região	Casta(s)	Ano	Tipo de vinho
JR42	Lisboa	Syrah	2009	Tinto
JR43	Lisboa	Alicante Bouschet	2007	Tinto
JR44	Lisboa	Syrah	2007	Tinto
JR45	Lisboa	Syrah	2010	Tinto
JR46	Lisboa	Aragonez	2008	Tinto
		Touriga Nacional		
JR47	Lisboa	Cabernet Sauvignon	2009	Tinto
		Merlot		
JR48	Lisboa	Aragonez	2009	Tinto
		Merlot		
JR49	Lisboa	Touriga Nacional	2008	Tinto
		Syrah		
		Petit Verdot		
JR50	Lisboa	Cabernet Sauvignon	2009	Tinto
JR51	Lisboa	Alicante Bouschet	2008	Tinto
		Cabernet Sauvignon		
JR52	Lisboa	Aragonez	?	Tinto
		Castelão		
JR53	Lisboa	Alicante Bouschet	2007	Tinto
JR54	Lisboa	Syrah	2009	Tinto
JR55	Lisboa	Syrah	2009	Tinto
JR56	Lisboa	Syrah	2009	Tinto
JR57	Lisboa	Touriga Nacional	2009	Tinto
		Cabernet Sauvignon		
JR58	Lisboa	Aragonez	2009	Tinto
JR59	Lisboa	Syrah	2006	Tinto
JR60	Lisboa	Merlot	2008	Tinto
		Syrah		
JR61	Lisboa	Touriga Nacional	2008	Tinto
JR62	Lisboa	Alicante Bouschet	2008	Tinto
		Cabernet Sauvignon		
JR63	Lisboa	Syrah	2008	Tinto
JR64	Lisboa	Syrah	2008	Tinto
		Touriga Nacional		
JR65	Lisboa	Syrah	2009	Tinto
JR66	Lisboa	Aragonez	2008	Tinto
		Merlot		
JR67	Lisboa	Aragonez	2009	Tinto
JR68	Lisboa	Touriga Nacional	2010	Rosé
JR69	Lisboa	Touriga Nacional	2008	Tinto
JR70	Lisboa	Syrah	2009	Tinto
JR71	Lisboa	Syrah	2009	Tinto

Tabela 2.1 (cont.3) – Amostragem

Código	Região	Casta(s)	Ano	Tipo de vinho
JR72	Lisboa	Touriga Nacional	2008	Tinto
		Syrah		
		Petit Verdot		
JR73	Lisboa	Touriga Nacional	2008	Tinto
JR74	Lisboa	Petit Verdot	2009	Tinto
		Merlot		
JR75	Lisboa	Touriga Nacional	2008	Tinto
JR76	Lisboa	Syrah	2008	Tinto
JR77	Lisboa	Touriga Nacional	2009	Tinto
		Cabernet Sauvignon		
JR78	Lisboa	Syrah	2008	Tinto
JR79	Lisboa	Touriga Nacional	2009	Tinto
		Cabernet Sauvignon		
JR80	Lisboa	Touriga Nacional	2009	Tinto
		Syrah		
JR81	Lisboa	Touriga Nacional	2008	Tinto
JR82	Lisboa	Touriga Nacional	2009	Tinto
JR83	Lisboa	Castelão	2007	Tinto
JR84	Lisboa	Touriga Nacional	2010	Rosé
		Syrah		
JR85	Lisboa	Merlot	2008	Tinto
JR86	Lisboa	Syrah	2006	Tinto
JR87	Lisboa	Syrah	2010	Rosé
JR88	Lisboa	Touriga Nacional	2010	Rosé

2.2 – Materiais, equipamento, reagentes e solventes

Nas Tabelas 2.2 e 2.3 estão apresentados os reagentes, solventes e equipamentos utilizados para a realização do presente trabalho experimental.

Tabela 2.2 – Reagentes e solventes utilizados

Reagentes e Solventes	Empresa	Cidade e país
Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)	Fluka	Steinheim, Alemanha
Ácido cafeico		
Ácido gálico		
Ácido ferúlico		
Reagente Folin-Ciocalteu	Chem-Lab	Zedelgem, Bélgica
Quercetina	Sigma-Aldrich	Steinheim, Alemanha
2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ)		
Sulfato de ferro (II) heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Panreac	Barcelona, Espanha
Cloreto de ferro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)		
Acetato de sódio trihidratado ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)		
Trans-Resveratrol (99.4%)	Dr. Ehrenstorfer GmbH	Augsburg, Alemanha
Acetonitrilo (99.9%)	Lab-Scan	Dublin, Irlanda
Metanol (99.9%)	Fischer Scientific	Waltham, EUA
Metanol (95%)	J. M. Gomes dos Santos	Portugal

Tabela 2.3 – Equipamento utilizado

Equipamento	Empresa	Cidade e País
Balança – Modelo AB204-S	Mettler Toledo	
Colorímetro – Modelo Libra S4	Biochrom	Cambridge, Inglaterra
Espectrofotómetro – Modelo Spekol 1500	Analytic Jena	Jena, Alemanha
Photochem		
HPLC	Thermo Fisher Scientific	Waltham, EUA
Desgaseificador - Modelo SCM 1000		
Bomba binária de gradiente - Modelo P2000		
Amostrador automático - Modelo AS1000		
Controlador UV - Modelo SM4000		
Detector de díodos - Modelo UV6000LP		
Coluna RP-C18 (150 mm x 2.1 i.d., 5 μm ,)	Atlantis	Dublin, Irlanda

2.3 – Procedimento experimental

2.3.1 – Avaliação da actividade antioxidante

2.3.1.1 – Poder antioxidante de redução férrica (FRAP)

O método de poder de redução férrica do vinho foi adaptado do método descrito por Benzie & Strain (1996).

O reagente para o teste do poder redutor férrico (FRAP) foi preparado da seguinte forma: para um volume final de 120 mL de reagente, misturaram-se imediatamente antes de proceder aos ensaios 10 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico (20 mM), 10 mL de uma solução de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) de 10 mM em HCl (11M) e 100 mL de tampão acetato (0,3M) a pH 3,6.

Para cada ensaio, utilizou-se 3 mL de reagente FRAP ao qual se adicionou 0,1 mL de amostra previamente diluída em água destilada. Os factores de diluição foram de 1:40 para o vinho tinto e de 1:4 para o vinho branco. A mistura reaccional ficou a incubar em banho a uma temperatura de 37°C durante 50 minutos. Ao final do período de incubação, procedeu-se à leitura da absorvância a um comprimento de onda de 593 nm.

Realizou-se o mesmo procedimento para a construção das rectas de calibração, substituindo a amostra por concentrações diferentes de sulfato ferroso (FeSO_4) variando entre 0,2 mM e 2,0 mM.

O poder de redução férrica das amostras foi expresso em equivalentes de sulfato ferroso.

2.3.1.2 – Actividade antiradicalar

2.3.1.2.1 – Neutralização do radical DPPH

O método utilizado foi baseado-se no método descrito por Brand-Williams *et al.* (1995).

Preparou-se uma solução de DPPH em metanol, com uma concentração de 70 mg/L. A 4 mL desta solução, adicionaram-se 0,2 mL de amostra previamente diluída em água destilada (amostras brancas diluídas de 1:2, amostras tintas diluídas de 1:20). Após um período de incubação de 40 minutos no escuro, procedeu-se à leitura da absorvância da solução a um comprimento de onda de 517 nm.

Para a construção da recta de calibração, realizou-se o ensaio da mesma forma, substituindo a amostra por concentrações diferentes de quercetina, variando entre 50 mg/L e 400 mg/L.

A actividade antiradicalar das amostras relativamente ao DPPH foi expressa em equivalentes de quercetina.

2.3.1.2.2 – Fotoquimioluminescência

A avaliação da actividade antiradicalar relativamente ao anião superóxido foi efectuada mediante uma reacção de fotoquimioluminescência, utilizando o aparelho Photochem na modalidade de medições aquosas (kit ACW). Foi seguido o método descrito pela marca para a avaliação da actividade antioxidante em vinhos.

O meio reaccional é obtido através da mistura de 1,5 mL de Reagente 1 (diluyente de amostras), 1,0 mL de Reagente 2 (solução tampão), 10 µL de amostra previamente diluída em Reagente 1 (diluição 1:20 para vinhos rosés e diluição 1:10 para vinhos brancos) e 25 µL de Reagente 3 (fotosensibilizador e reagente de detecção).

No caso da construção da curva de calibração, a amostra é substituída por diferentes volumes variando entre 0 µL e 30 µL de Reagente 4 (ácido ascórbico que é o padrão de calibração para a quantificação de antioxidantes solúveis em água).

A actividade antiradicalar das amostras relativamente ao anião radical superóxido foi expressa em equivalentes de ácido ascórbico.

2.3.1.3 – *Quantificação dos compostos fenólicos totais – Reacção de Folin-Ciocalteu*

A quantificação dos compostos fenólicos totais das amostras foi realizada segundo o método de Folin-Ciocalteu. Para tal, realizou-se uma adaptação da versão deste método descrita pela OIV.

O meio reaccional é preparado, na seguinte ordem, por 0,1 mL de amostra previamente diluída em água destilada, à qual se adicionou 5 mL de água destilada, 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu (0,2 N), 2 mL de uma solução de carbonato de sódio (20%) e 2,4 mL de água destilada. O factor de diluição das amostras tintas foi de 1:10 e das amostras brancas de 1:2. Após um período de incubação de 30 minutos no escuro, realiza-se a leitura da absorvância a um comprimento de onda de 750 nm.

Para a realização da recta de calibração, seguiu-se o mesmo procedimento apenas substituindo a amostra por diferentes concentrações de ácido gálico, variando de 50 mg/L até 400 mg/L. Desta forma, os compostos fenólicos totais das amostras foram expressos em equivalentes de ácido gálico.

2.3.2 – Quantificação de compostos por HPLC-DAD

Para a quantificação de diferentes compostos por HPLC-DAD, as amostras foram previamente filtradas, utilizando um filtro de 0,22 µm, de modo a remover partículas que pudessem interagir com a coluna de cromatografia, danificar a mesma ou até alterar os próprios resultados. Em casos pontuais, as amostras foram diluídas com metanol ultrapuro.

O sistema de HPLC utilizado é constituído por um desgaseificador (modelo SCM 1000), uma bomba binária de gradiente (modelo P2000), um amostrador automático (modelo AS1000), um controlador UV (modelo SM4000) e um detector de díodos (modelo UV6000LP).

O método utilizado foi adaptado do método descrito por Staško *et al.* (2008). As análises foram efectuadas numa coluna RP-C18 (150 mm x 2.1 i.d., 5 µm, Atlantis, Dublin, Irlanda). A fase móvel foi composta por 0,3% de ácido fórmico em água (A) e acetonitrilo (B) combinados de acordo com o programa de eluentes descrito na Tabela 2.4. O fluxo da fase móvel foi de 0,8 mL/min e o volume de injeção foi 20 µL.

Tabela 2.4 – Programa de eluentes aplicado

Tempo de análise (minutos)	Eluente B (%)
0 – 5	5
5 – 10	5 – 20
10 – 20	20 – 25
20 – 30	25 – 5

A aquisição de resultados em DAD foi realizada em modo de varrimento total, num intervalo de 210 a 540 nm, e utilizando três canais de detecção selectivos (280, 320 e 360 nm) seleccionados por corresponderem a comprimentos de onda de absorção de ácidos benzóicos, ácidos hidroxicinâmicos e flavonóides, respectivamente. Foram extraídos cromatogramas a comprimentos de onda selectivos correspondentes aos máximos de absorvância de cada um dos compostos estudados: 270 nm (ácido gálico), 306 nm (trans-resveratrol), 320 nm (ácido cafeico), 323 nm (ácido ferúlico) e 370 nm (quercetina).

Para as rectas de calibração, os padrões foram preparados em metanol ultrapuro com diferentes concentrações, variando entre 5 e 100 mg/L para o ácido gálico ($R^2 = 0,9999$), entre 5 e 50 mg/L para o trans-resveratrol ($R^2 = 0,9964$), entre 5 e 100 mg/L para o ácido cafeico ($R^2 = 0,9998$), entre 0,5 e 5 mg/L para o ácido ferúlico ($R^2 = 0,9958$) e entre 1 e 20 mg/L para a quercetina ($R^2 = 0,9958$).

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) de cada um destes compostos foram determinados seguindo o método de cálculo do desvio padrão residual da curva:

$LD = 3,3 \times \frac{S_{x/y}}{a}$ e $LQ = 10 \times \frac{S_{x/y}}{a}$, onde a corresponde ao declive da recta, $S_{x/y} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{N-2}}$, N corresponde ao número de pontos de calibração, y_i corresponde valor da área extraída do cromatograma para o composto em questão e \hat{y}_i corresponde ao valor médio das áreas extraídas do cromatograma para o composto em questão.

2.3.3 – Cor

Para a determinação dos parâmetros de cor das amostras, foram realizadas leituras da absorvância das amostras aos comprimentos de onda de 420 nm, 520 nm e 620 nm.

Uma vez que não existe proporcionalidade entre a absorvância dos vinhos e o factor de diluição, as amostras não foram diluídas (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006b). Para contornar esta situação, foram utilizadas células de 0,1 cm de espessura para a leitura das absorvâncias dos vinhos tintos.

A intensidade corresponde à soma das leituras obtidas aos comprimentos de onda de 420 nm, 520 nm e 620 nm, enquanto a tonalidade corresponde à razão entre a leitura obtida ao comprimento de onda de 420 nm pela obtida ao comprimento de onda de 520 nm (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006b).

A composição da coloração é calculada pela razão entre as absorvâncias medidas aos comprimentos de onda respectivos pela intensidade da cor, valor ao qual se aplica um factor de 100 para apresentar os resultados sob a forma de percentagem (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006b).

O brilho dos vinhos (B) é calculado de acordo com a seguinte fórmula (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006b): $B = \left(1 - \frac{A_{420} + A_{620}}{2 \times A_{520}}\right) \times 100$, onde A_{420} , A_{520} e A_{620} são os valores de absorvância medidos aos comprimentos de onda de 420, 520 e 620 nm, respectivamente.

3 – Resultados e Discussão

Neste trabalho procurou-se avaliar a actividade antioxidante de vinhos portugueses, produzidos em diferentes regiões do país, utilizando diferentes castas de uva e tipos de uva (brancas e tintas).

Seleccionaram-se 88 vinhos (63 tintos, 21 brancos e 4 rosés), produzidos entre 2006 e 2010, nas regiões vitivinícolas de Lisboa, Tejo e Península de Setúbal.

A amostragem centrou-se em vinhos jovens produzidos nos anos 2008 a 2010 (Figura 3.1), pois pretendiam-se avaliar vinhos ainda não sujeitos aos processos de mudança de composição associados ao envelhecimento.

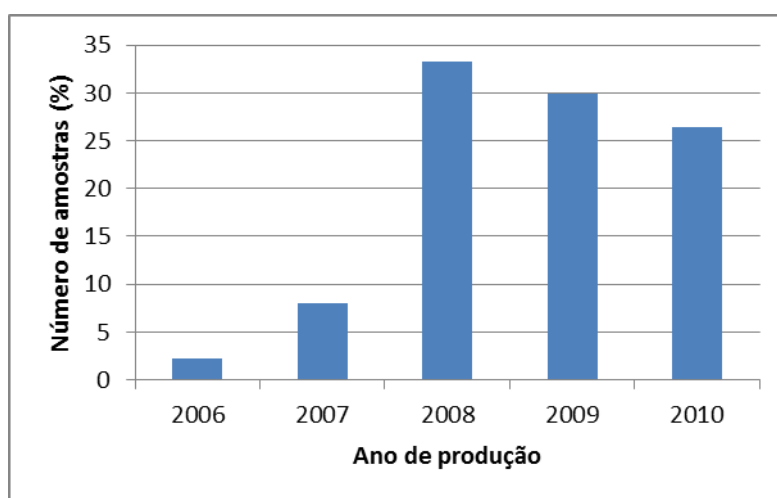


Figura 3.1 – Distribuição das amostras de vinho estudadas pelos respectivos anos de produção

Quanto à origem geográfica seleccionaram-se maioritariamente vinhos da região vitivinícola com a indicação geográfica Lisboa (Figura 3.2), que de acordo com as definições do Instituto da Vinha e do Vinho abrange todos os concelhos da faixa atlântica a Norte do estuário do Tejo, confinando a Norte com a Beira e a Leste com o Ribatejo. Em segundo lugar estão representados vinhos da região vitivinícola com indicação geográfica Península de Setúbal que corresponde à zona litoral Oeste a Sul de Lisboa, compreendendo todo o distrito de Setúbal. Por fim, incluíram-se também alguns vinhos da região com indicação geográfica Tejo que corresponde a todas as regiões adjacentes ao vale do Tejo incluindo a Lezíria do Tejo, a zona compreendida entre o Vale do Tejo as serras de Porto de Mós, Candeeiros e Montejunto, e a zona de Charneca, localizada na margem esquerda do Rio Tejo a sul da zona de Lezíria. Em qualquer destas regiões vitivinícolas foram seleccionados mais vinhos tintos do que vinhos brancos e mais vinhos monovarietais do que multivarietais (Figura 3.2).

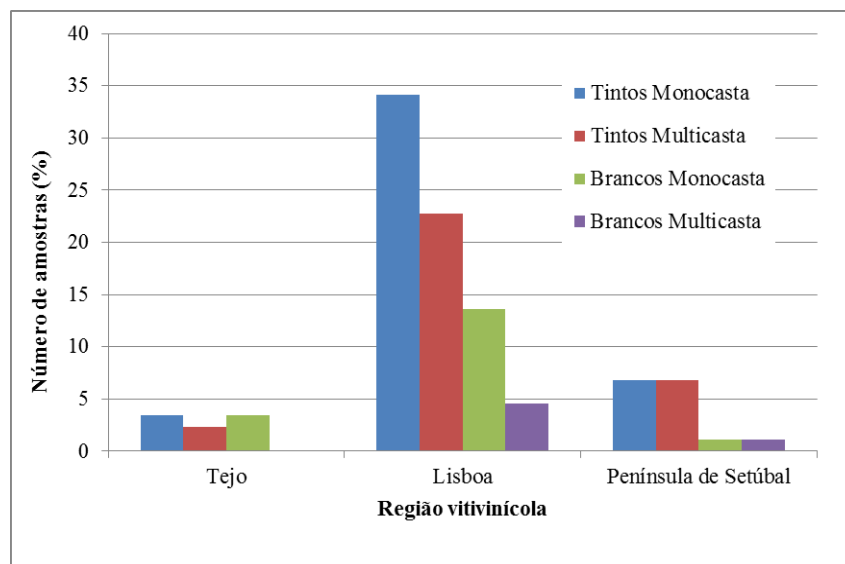


Figura 3.2 – Distribuição da amostragem em termos de região e número de castas componentes (monocasta e multicasta).

As castas mais representadas nos vinhos monovarietais tintos foram Syrah e Touriga Nacional (região de Lisboa), e Castelão (região da Península de Setúbal). As castas Arinto e Chardonnay predominaram no caso dos vinhos monovarietais brancos da região de Lisboa enquanto a casta Fernão Pires foi a mais frequente nos vinhos monovarietais brancos da região da Península de Setúbal.

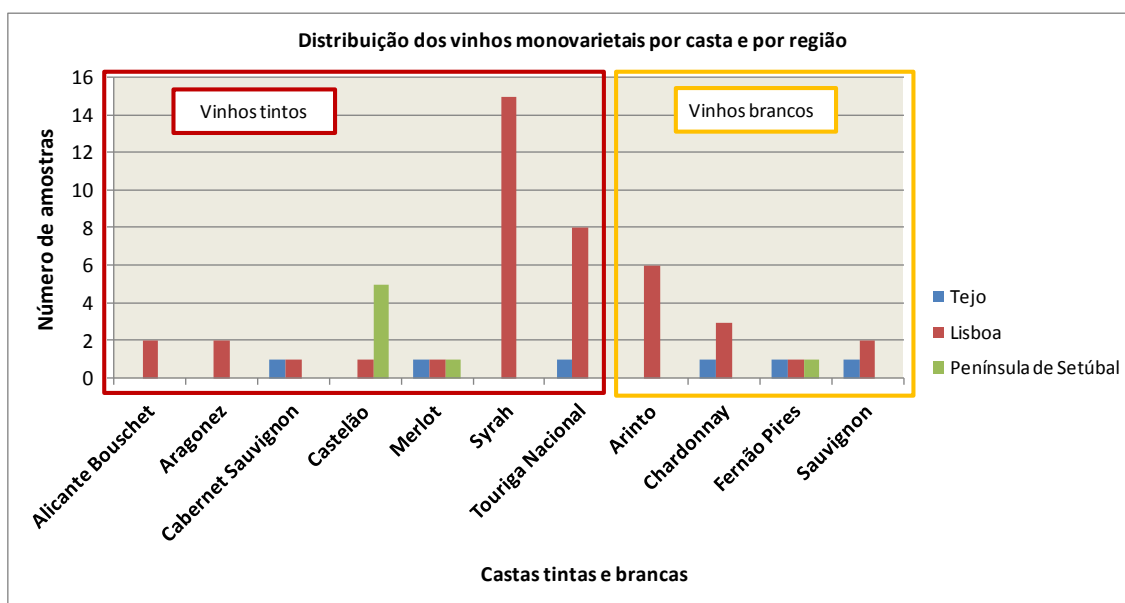


Figura 3.3 – Distribuição das amostras por casta e região para os vinhos tintos e brancos monovarietais.

A escolha das castas reflectiu as preferências actuais dos produtores traduzidas na disponibilidade comercial de vinhos de uma determinada casta, não tendo havido uma selecção intencional de uma casta específica.

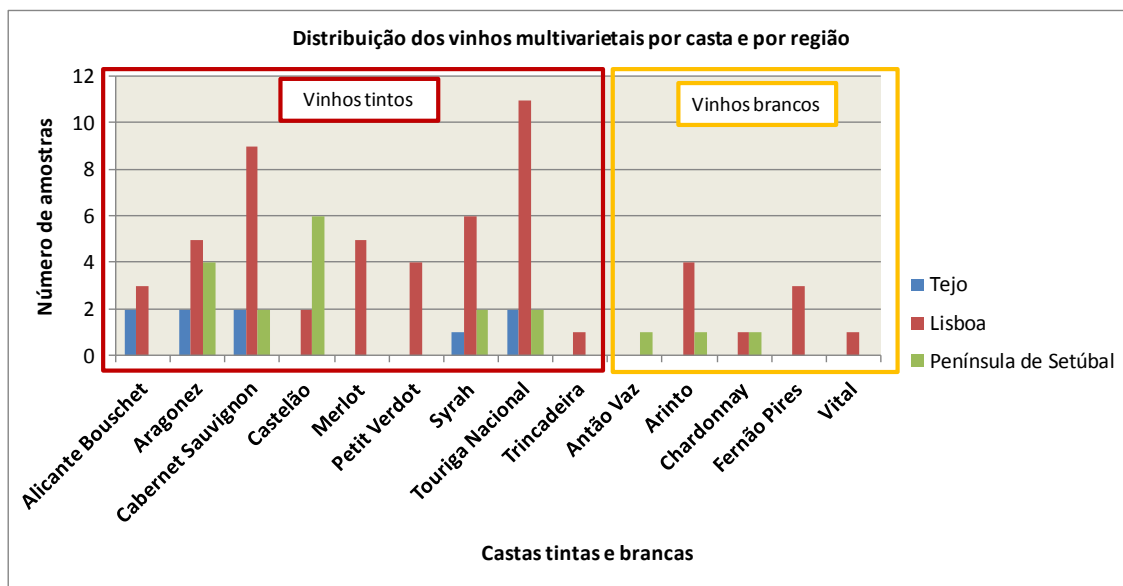


Figura 3.4 – Distribuição das amostras por casta e região para os vinhos tintos e brancos multivarietais.

No caso dos vinhos multivarietais tintos Cabernet Sauvignon e Touriga Nacional foram as castas mais frequentemente encontradas nos vinhos tintos da região de Lisboa enquanto Castelão e Aragonês foram as castas mais utilizadas nos vinhos multivarietais tintos da região da Península de Setúbal. Os vinhos brancos multivarietais da região de Lisboa apresentaram predominância das castas Arinto e Fernão Pires.

As castas Petit Verdot e Trincadeira estão presentes apenas em vinhos multivarietais tintos e as castas Antão Vaz e Vital só aparecem como componentes de vinhos multivarietais brancos.

3.1 – Actividade antioxidante

A actividade antioxidante dos vinhos seleccionados foi avaliada através de 4 reacções específicas que permitem testar a capacidade de neutralização de diferentes espécies pro-oxidantes ou a presença de um determinado tipo de antioxidantes.

A presença de compostos capazes de doar electrões a iões metálicos convertendo-os nas suas formas reduzidas foi avaliada através da reacção com iões férricos (poder antioxidante de redução férrica, FRAP).

A actividade antiradicalar, ou seja, a presença de espécies antioxidantes capazes de neutralizar radicais livres por doação de um hidrogénio (1 electrão e 1 protão), foi avaliada por reacção com o radical DPPH, muito utilizado na avaliação da actividade antiradicalar *in vitro*, e com o radical anião superóxido, que tem relevância biológica pois ocorre a nível celular.

Por fim, avaliou-se a presença de compostos fenólicos através da reacção de Folin-Ciocalteu que sendo uma reacção específica para compostos com uma determinada característica estrutural (serem derivados fenólicos), é também uma avaliação da actividade antioxidante pois os compostos fenólicos são geralmente redutores e sequestradores de radicais livres.

3.1.1 – Poder antioxidante de redução férrica (FRAP)

O poder de redução férrica das amostras analisadas é apresentado sob a forma de equivalentes de FeSO_4 em mM. Os resultados estão representados nas Figuras 3.5 e 3.6.

O poder de redução férrica dos vinhos tintos analisados apresenta um mínimo e um máximo de 33,0 e 85,7 mM de FeSO_4 , respectivamente. Estes valores são da mesma ordem de grandeza de determinações análogas efectuadas por outros autores (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 – Valores de poder de redução férrica de vinhos tintos

Poder de redução férrica (equivalentes de FeSO_4 em mM)		Autores	Ano
Mínimo	Máximo		
21	32	V. Katalanić <i>et al.</i>	2004
27,7	101,5	M. D. Rivero-Pérez <i>et al.</i>	2008
10,5	20,6	J. Woraratphoka <i>et al.</i>	2007
12	66	A. Versari <i>et al.</i>	2010

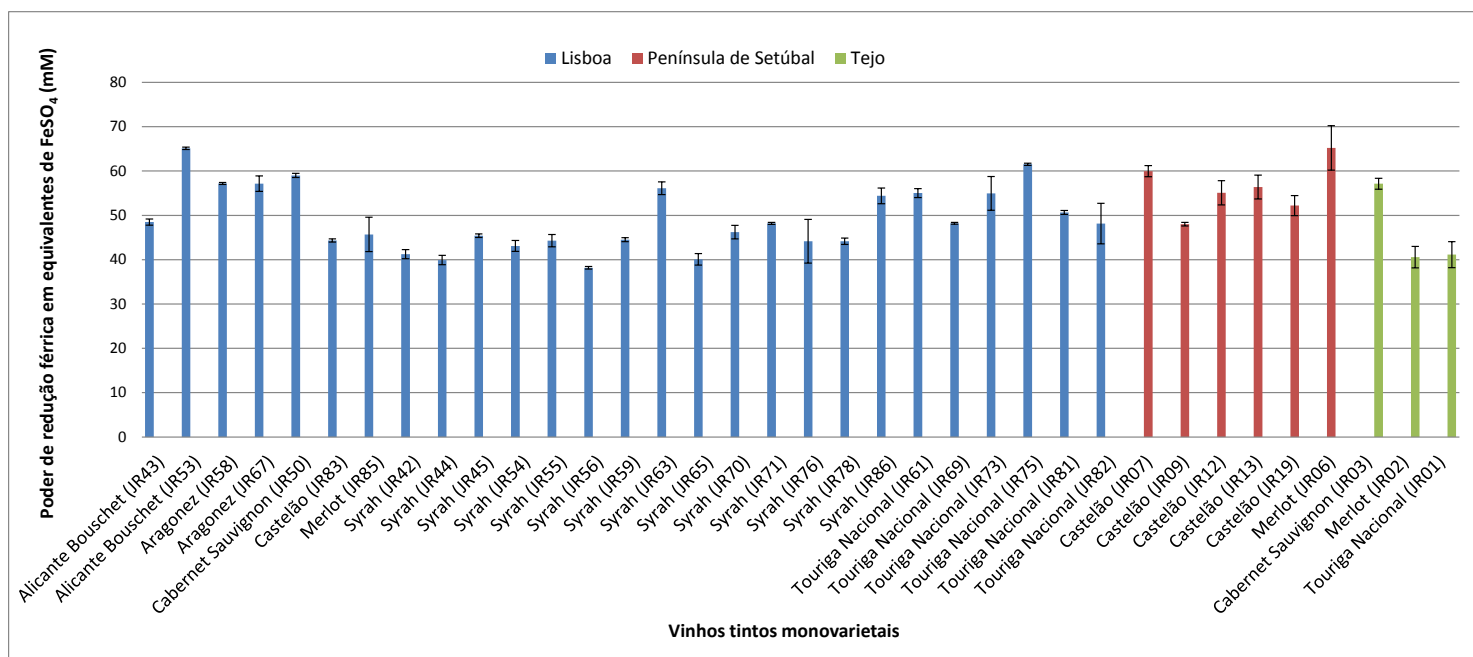


Figura 3.5 – Poder antioxidante de redução férrica de vinhos tintos monovarietais

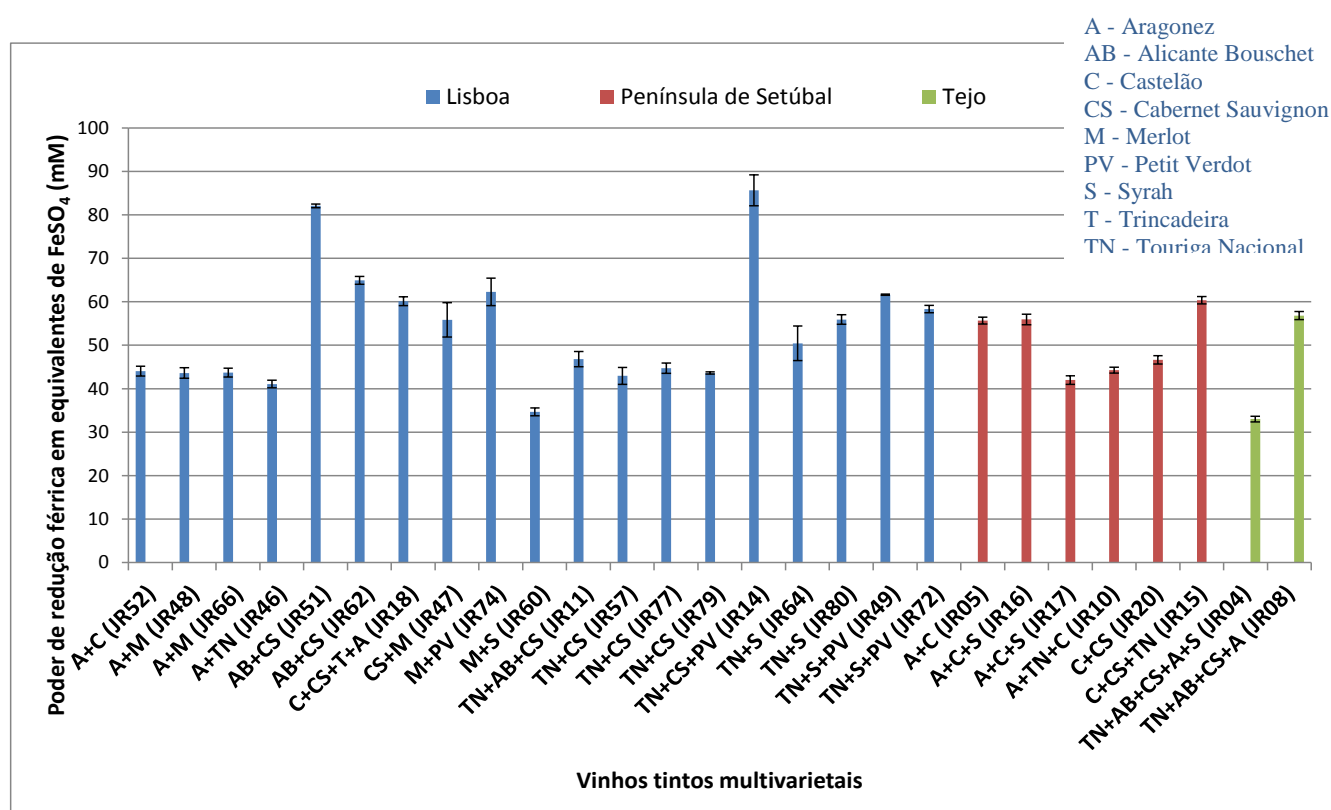


Figura 3.6 – Poder antioxidante de redução férrica de vinhos tintos multivarietais

Numa análise mais detalhada podemos referir que os resultados de poder redutor férrico obtidos neste trabalho para vinhos monovarietais e multivarietais ultrapassam os extremos das gamas apresentadas por V. Katalanić *et al.* em 2004, por J. Woraratphoka *et al.* (2007) e por A. Versari *et al.* em 2010, no entanto, encontram-se na gama dos valores apresentados por M. D. Rivero-Pérez *et al.* em 2008.

Estas diferenças são expectáveis uma vez que se trata de vinhos produzidos em condições muito diferentes. De facto as diferenças que existem entre vinhos da mesma região de um país devem acentuar-se quando se consideram vinhos provenientes de países diferentes.

É de realçar que a maior parte dos vinhos tintos apresentaram valores de poder redutor férrico inferiores a 60 mM equivalentes de FeSO_4 , valor ultrapassado apenas por 3 vinhos monovarietais e por 6 vinhos multivarietais. Valores de poder redutor férrico superiores a 70 mM foram encontrados apenas para 2 vinhos tintos multivarietais que se destacam dos restantes no valor desta propriedade.

Em termos das três regiões consideradas os resultados foram comparáveis sobretudo tendo em conta que a amostragem não é igualmente representativa da região de origem.

Os resultados obtidos para as diferentes castas de vinhos tintos e em particular no caso dos vinhos monovarietais evidenciam que outros factores além da região e da casta afectam as propriedades antioxidantes destes vinhos. Esta observação parece reflectir a influência de factores como pH, concentração de SO_2 , e processos de fermentação na transferência de antioxidantes da uva para o mosto e nos equilíbrios químicos que envolvem esses antioxidantes durante o processo de produção e maturação do vinho.

O poder antioxidante de redução férrica dos vinhos brancos monovarietais e multivarietais é apresentado na Figura 3.7. Esta propriedade apresentou um mínimo e um máximo de, respectivamente, 4,9 mM e 13,4 mM equivalentes de FeSO_4 , para vinhos da região de Lisboa e de 3,8 mM a 4,9 mM para vinhos das regiões Tejo e Península de Setúbal.

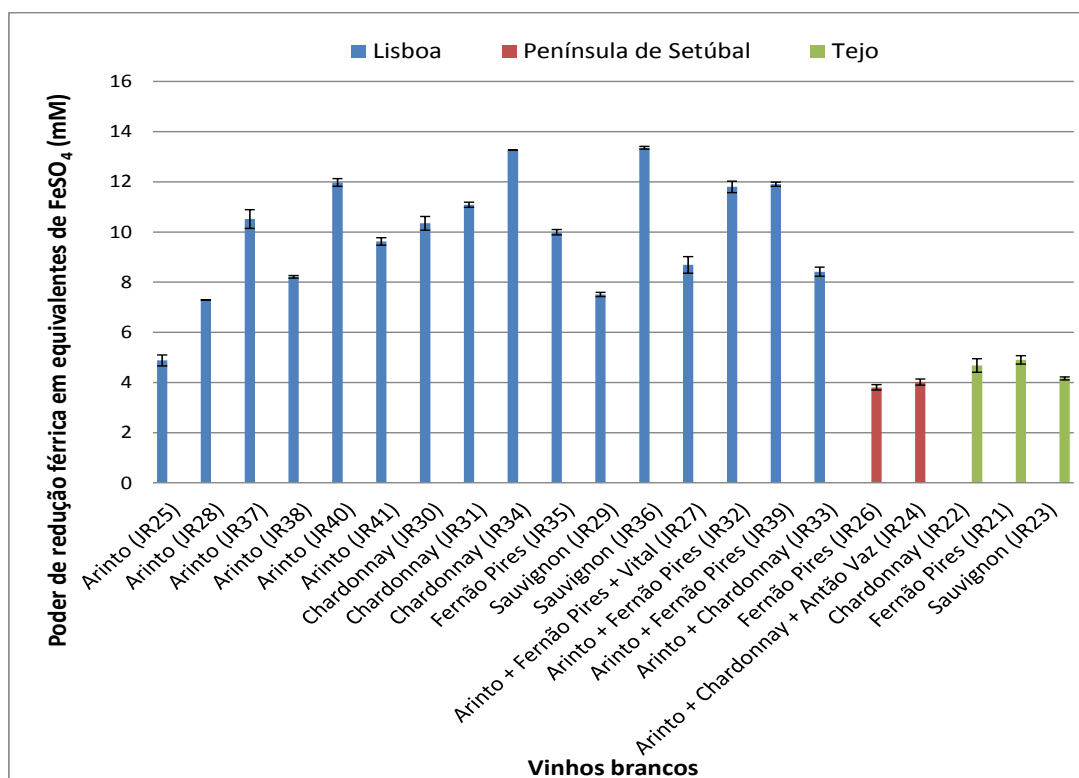


Figura 3.7 – Poder antioxidante de redução férrica dos vinhos brancos monovarietais e multivarietais

Assim constatou-se que os vinhos brancos das regiões de Tejo e Península de Setúbal apresentaram valores de poder redutor férrico comparáveis com os encontrados na literatura para vinhos brancos. V. Katalanić *et al.* (2004) apresentam uma gama de redução férrica para os vinhos brancos de 2,213 a 3,856 mM de equivalentes de Fe^{2+} , sendo que o máximo apresentado corresponde ao mínimo analisado nas presentes amostras. J. Woraratphoka *et al.* (2007) apresenta uma gama de poder de redução férrica de vinhos brancos de 1,9 a 6,4 mM de equivalentes de Fe^{2+} , cujo valor mínimo é significativamente mais baixo do que os valores encontrados e o valor máximo está incluído na gama das amostras analisadas no presente trabalho.

Os vinhos brancos da região da Estremadura (JR25 e JR27 a JR41) apresentam um maior poder de redução férrica dos que os vinhos brancos provenientes das outras duas regiões, e do que os vinhos brancos referidos na literatura, mostrando que o solo, clima e eventualmente processo de vinificação podem influenciar a composição final do vinho, a nível de compostos redutores.

A casta foi o factor que mostrou menor correlação aparente com a actividade redutora no vinho registando-se valores bastante diferentes em vinhos com a mesma casta, e particularmente no caso dos vinhos monovarietais. No entanto, constata-se a diferença esperada, (V. Katalanić *et al.*, 2004; J. Woraratphoka *et al.*, 2007), entre vinhos tintos e brancos observando-se um poder redutor nos vinhos brancos significativamente inferior ao dos vinhos brancos, independentemente de outros factores como casta ou região.

Os métodos de vinificação são de extrema relevância para a composição final do vinho, o que se pode observar claramente com o caso dos vinhos rosés que apresentam consistentemente um poder de redução férrica inferior ao dos restantes vinhos tintos (Figura 3.8).

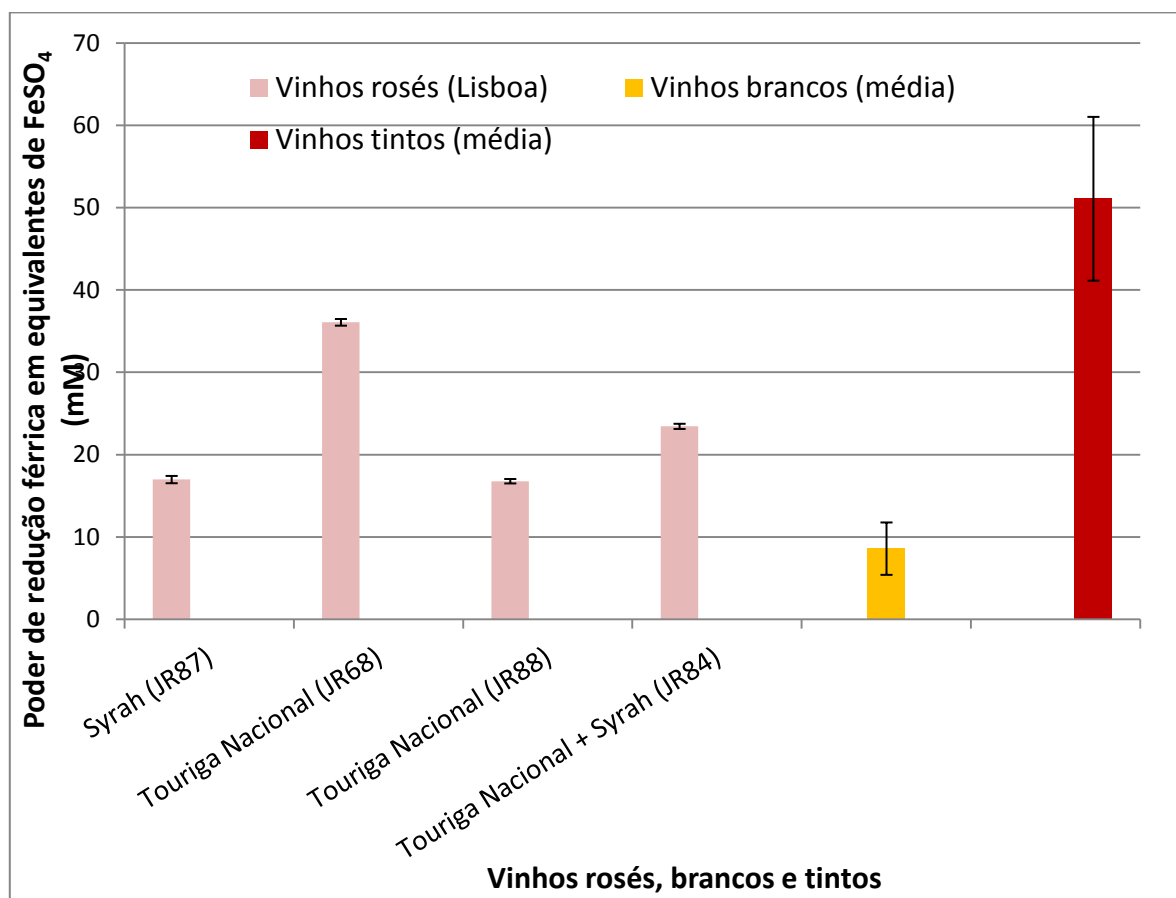


Figura 3.8 – Poder antioxidante de redução férrica dos vinhos rosés monovarietais e multivarietais e comparação com valores médios desta propriedade obtidos para vinhos brancos e vinhos tintos

Ao considerar vinhos da mesma casta, mesma região e mesmo ano, e portanto as mesmas uvas sujeitas às mesmas condições climatéricas e ao mesmo tipo de solo, onde uma das diferenças primordiais entre ambas reside no método de vinificação, observa-se uma diferença substancial a nível do poder de redução férrica de cada uma. A amostra JR45 (45 mM de equivalentes de FeSO_4) apresenta um poder de redução férrica cerca de três vezes superior ao da amostra JR87 (17 mM de equivalentes de FeSO_4).

A comparação do poder de redução férrica dos vinhos rosés com a bibliografia não foi possível uma vez que na esmagadora maioria dos casos de estudo de actividade antioxidante de vinhos apenas serem considerados vinhos brancos e tintos. É de referir que o poder de redução férrica dos vinhos rosés analisados é inferior ao dos vinhos tintos e superior ao dos vinhos brancos.

3.1.2 – Actividade antiradicalar

3.1.2.1 – Teste do DPPH

A actividade antiradicalar DPPH das amostras foi expressa em equivalentes de quercetina, em g/L. Os resultados deste ensaio estão apresentados nas figuras 3.9 a 3.11.

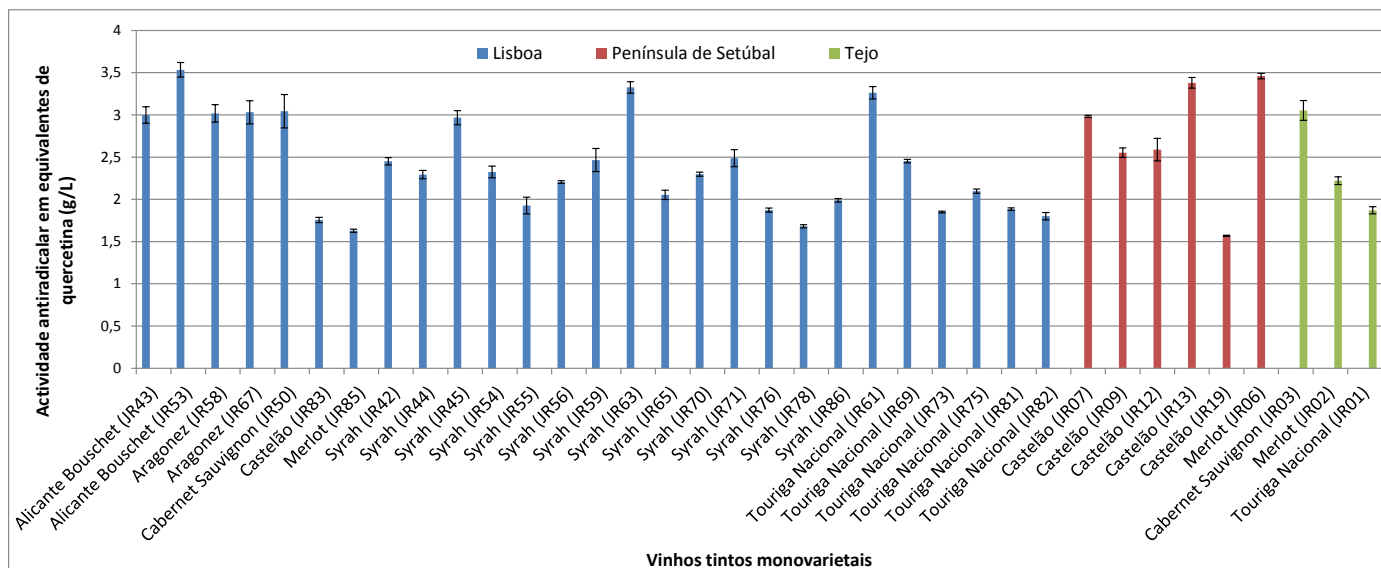


Figura 3.9 – Actividade antiradicalar relativamente ao radical DPPH de vinhos tintos monovarietais.

A actividade antiradicalar face ao DPPH dos vinhos tintos analisados apresenta uma gama entre 1,6 e 5,4 g/L de equivalentes de quercetina, valores que correspondem a uma gama de 6,3 e 25,1 mM de equivalentes de trolox.

De entre os vinhos tintos monovarietais da região de Lisboa, destacam-se dois vinhos da casta Syrah, um vinho da casta Touriga Nacional e os vinhos das castas Alicante Bouschet, Aragonez e Cabernet Sauvignon por apresentarem actividade antiradicalar acima de 2,5 g/L equivalentes de quercetina. Estes vinhos apresentaram também valores relativamente elevados de poder redutor férrico o que parece confirmar a presença de espécies antioxidantes em concentração elevada.

Também no caso das regiões de Tejo e Península de Setúbal se observa alguma coincidência entre os vinhos com valores mais elevados de actividade antiradicalar relativamente ao DPPH e os vinhos com valores mais elevados de actividade redutora férrica apesar de o mesmo não se poder afirmar para vinhos com actividades médias ou baixas dentro da gama encontrada.

Estes resultados parecem indicar que determinados vinhos contêm antioxidantes cuja natureza ou concentração lhes conferem propriedades antioxidantes aumentadas em diferentes ensaios desta actividade enquanto outros vinhos apresentam uma actividade antioxidante que pela sua natureza ou concentração só é elevada em ensaios específicos.

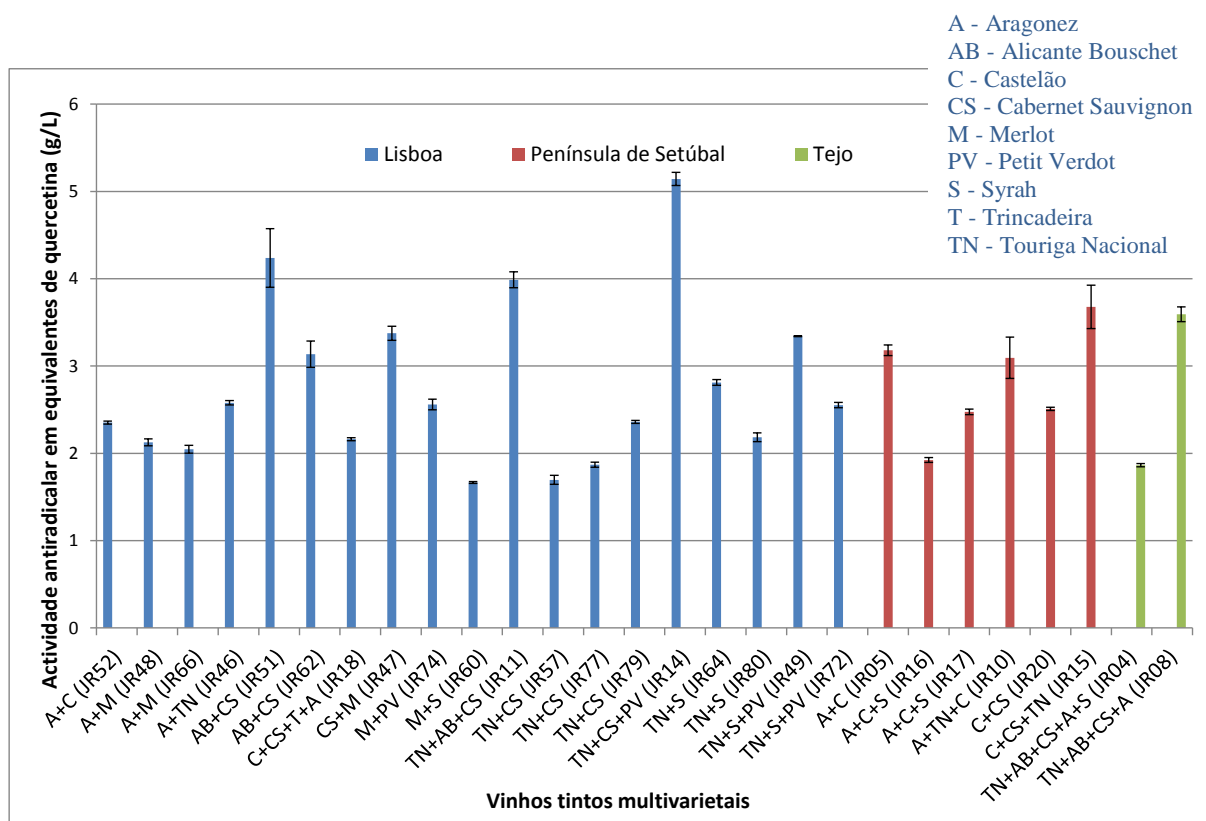


Figura 3.10 – Actividade antirradicalar relativamente ao radical DPPH de vinhos tintos multivarietais.

Também no caso dos vinhos multivarietais encontramos uma correspondência entre a actividade antirradicalar e a actividade redutora dos vinhos com os valores mais elevados destas duas propriedades; esta correlação observou-se para vinhos com as castas (Alicante Bouschet + Cabernet Sauvignon), (Touriga Nacional + Alicante Bouschet + Cabernet Sauvignon), (Touriga Nacional + Cabernet Sauvignon + Petit Verdot), da região de Lisboa, vinho com as castas (Castelão + Cabernet Sauvignon + Touriga Nacional) da região da Península de Setúbal e vinho com as castas (Touriga Nacional + Alicante Bouschet + Cabernet Sauvignon + Aragonez) da região do Tejo.

Ao comparar os resultados obtidos no presente trabalho que, como foi referido, se situam numa gama de 6,3 e 25,1 mM de equivalentes de trolox com os valores propostos pela literatura para vinhos tintos e rosés (Tabela 3.2), constatamos que os vinhos portugueses apresentaram valores comparáveis com os valores obtidos para vinhos de outros países, situando-se nos valores mais elevados, quer no que se refere ao valor mínimo como ao valor máximo de actividade antirradicalar.

J. Mulero *et al.* (2009), F. Alén-Ruiz *et al.* (2009) e M.-I. Salaha *et al.* (2008) apresentam gamas de valores significativamente mais baixos que os encontrados no presente trabalho. E.F. Gris *et al.* (2011), M.D. Rivero-Pérez *et al.* (2008) e I.V. Vrček *et al.* (2011) apresentam gamas de valores de actividade antirradicalar relativamente altas comparáveis aos valores de actividade antirradicalar obtidos para os vinhos estudados.

Tabela 3.2 – Valores da actividade antiradicalar de vinhos tintos e rosés face ao DPPH

Actividade antiradicalar (equivalentes de trolox, mM)		Autores	Ano
Mínimo	Máximo		
9,9	25,5	M.D. Rivero-Pérez <i>et al.</i>	2008
2,19	7,47	M.-I. Salaha <i>et al.</i>	2008
6,02	6,78	J. Mulero <i>et al.</i>	2009
3,2	6,7	F. Alén-Ruiz <i>et al.</i>	2009
4,943	20,639	I.V. Vrček <i>et al.</i>	2011
11,2	18	E.F. Gris <i>et al.</i>	2011

De maneira geral, a actividade antiradicalar dos vinhos tintos proposta pelos vários autores apresenta valores bastante distintos reflectindo os efeitos já referidos na análise da actividade redutora que contribuem para a variabilidade na composição do vinho e que influenciam consequentemente as suas propriedades funcionais.

Também neste trabalho se observou este efeito pois ao comparar as amostras JR07 (15,3 mM de equivalentes de trolox) e JR19 (6,3 mM de equivalentes de trolox), ambas produzidas na região da Península de Setúbal, no mesmo ano e a partir da mesma casta, denota-se uma actividade antiradicalar bastante diferente entre ambas, sendo que a primeira amostra apresenta um valor mais de duas vezes superior ao da segunda amostra.

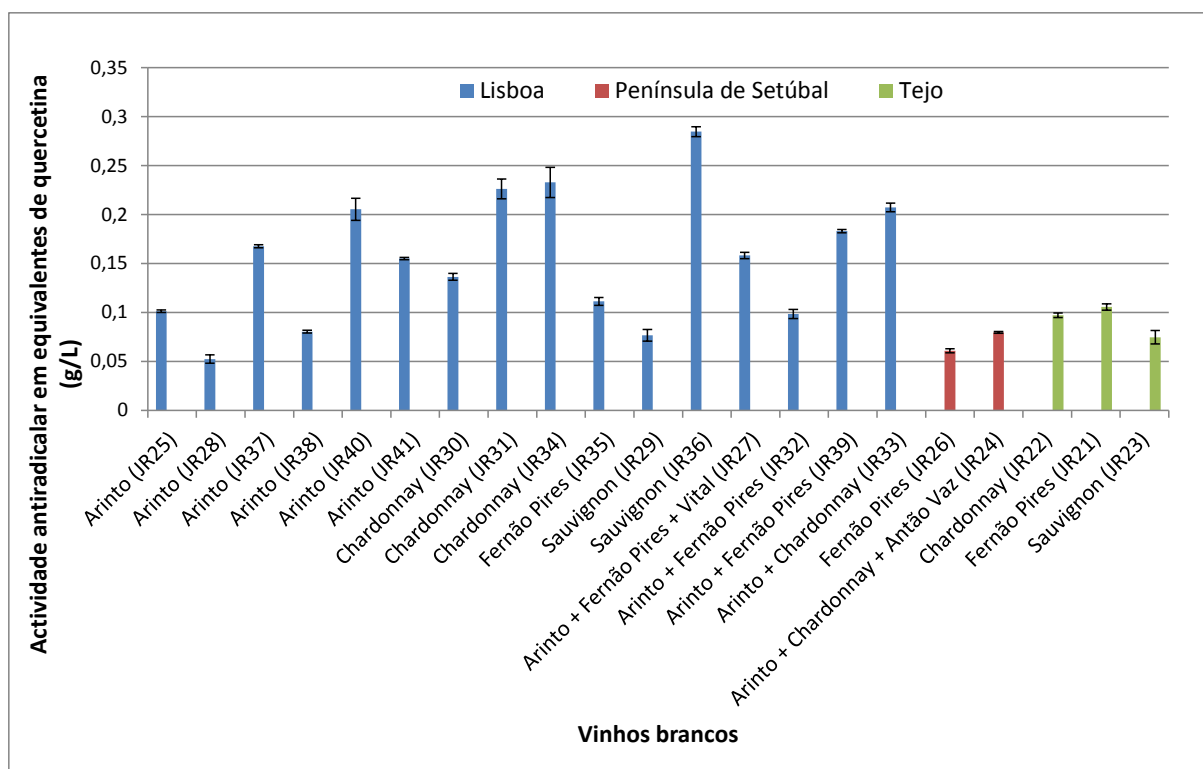


Figura 3.11 – Actividade antirradicalar dos vinhos brancos monovarietais e multivarietais relativamente ao radical DPPH

A actividade antirradicalar dos vinhos brancos da região de Lisboa (Figura 3.11) apresenta um mínimo e máximo respectivos de 0,05 g/L e 0,29 g/L equivalentes de quercetina, registando-se uma clara diferença relativamente às regiões da Península de Setúbal e do Tejo, com actividade antirradicalar situada numa gama mais baixa (entre 0,06 g/L e 0,11 g/L equivalentes de quercetina). As diferenças nas actividades antirradicalares de vinhos das mesmas castas mas produzidos em diferentes regiões vem reforçar a hipótese de que os factores solo, clima e processo de vinificação influenciam de forma determinante a actividade antioxidante do vinho.

Tanto para a actividade redutora como para a actividade antirradicalar relativa ao DPPH, só se observaram diferenças marcadas entre regiões no caso dos vinhos brancos, o que parece indicar que os factores geográficos e de processo afectam particularmente espécies antioxidantes que são relevantes para o vinho branco mas que não têm um contributo tão importante para a actividade antioxidante dos vinhos tintos.

A gama de valores obtida para a actividade antirradicalar dos vinhos brancos analisados em equivalentes de quercetina corresponde a uma gama de 0,13 a 1,63 mM de equivalentes de trolox. Estes valores encontram-se em concordância com os referidos na literatura (Tabela 3.3), sendo no entanto ligeiramente menos elevados que os valores propostos por M.S. Fernández-Pachón *et al.* (2006) e A. Rodríguez-Bernaldo de Quirós *et al.* (2009).

Tabela 3.3 – Valores da actividade antiradicalar de vinhos brancos face ao DPPH

Actividade antiradicalar (mM equivalentes de trolox)		Autores	Ano
Mínimo	Máximo		
0,39	2,21	M.S. Fernández-Pachón <i>et al.</i>	2006
0,77	2,01	A. Rodríguez-Bernaldo de Quirós <i>et al.</i>	2009
0,36	0,84	S. Kallithraka <i>et al.</i>	2009
0,70	1,16	I. V. Vrček <i>et al.</i>	2011

A actividade antiradicalar dos vinhos rosés incluídos neste trabalho é apresentada na Figura 3.12.

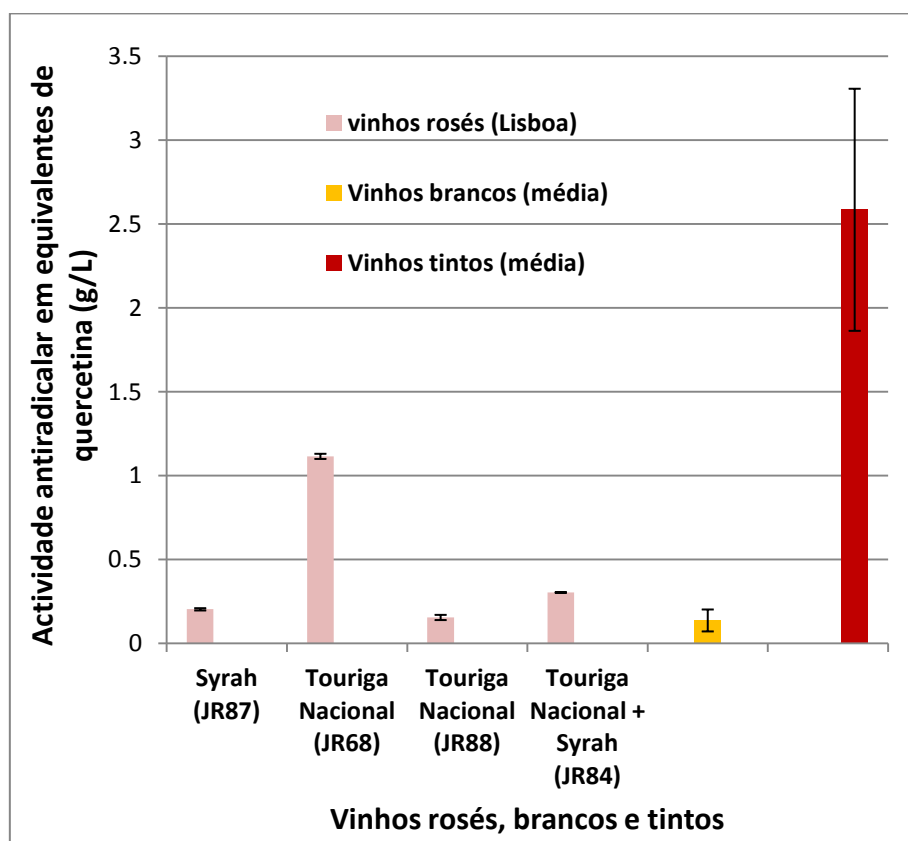


Figura 3.12 – Actividade antiradicalar dos vinhos rosés relativamente ao radical DPPH e comparação com os valores médios desta propriedade obtidos para os vinhos brancos e os vinhos tintos.

Os valores de actividade antiradicalar obtidos neste trabalho para os vinhos rosés expressos em equivalentes de trolox situaram-se na gama de 0,9 e 4,0 mM de equivalentes de trolox sendo comparáveis com os valores encontrados por H. Li *et al.* (2009) para o mesmo tipo de vinhos, e que oscilaram entre 1,4 e 3,4 mM de equivalentes de trolox.

Tal como observado para a actividade redutora, os resultados de actividade antiradicalar obtidos para os vinhos rosés são mais baixos que os dos vinhos tintos, mas mais elevados que os dos vinhos brancos.

3.1.2.2 – Actividade de sequestração do radical anião superóxido por fotoquimioluminescência

A actividade antiradicalar dos vinhos relativamente ao anião superóxido foi avaliada por fotoquimioluminescência, e os resultados obtidos são apresentados nas figuras 3.13 e 3.14 expressos equivalentes de ácido ascórbico.

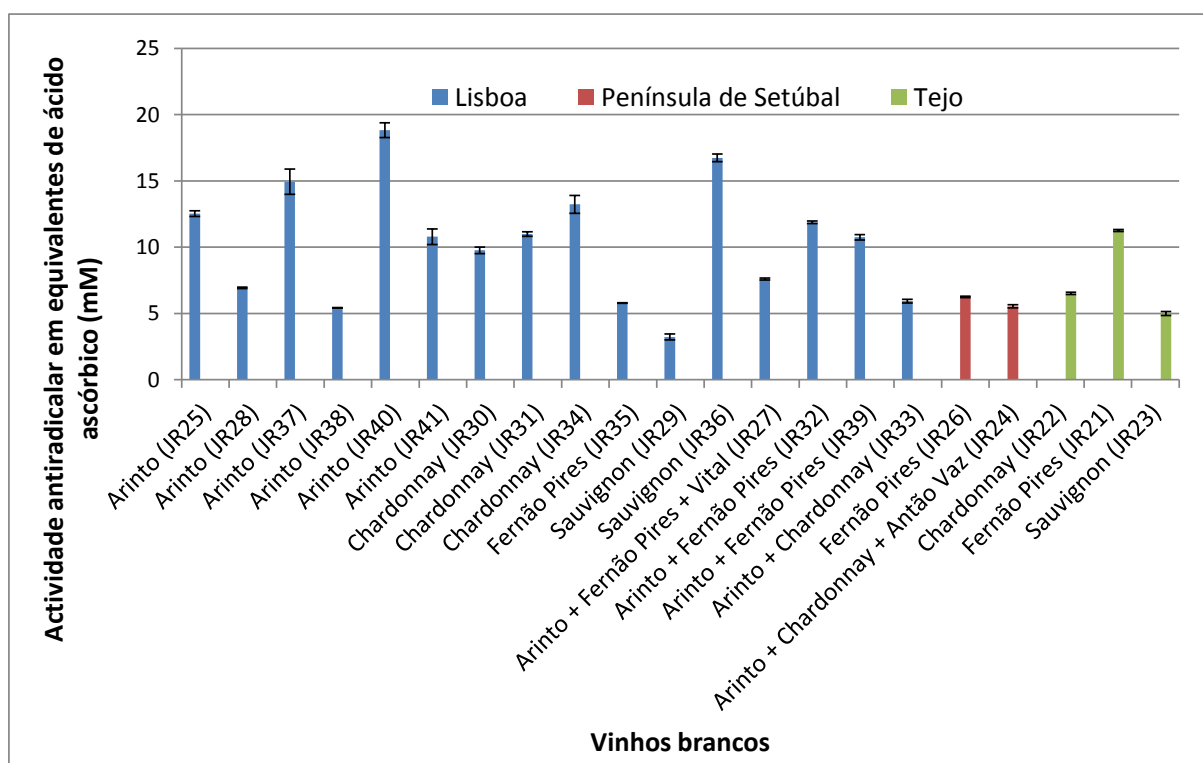


Figura 3.13 – Actividade antiradicalar de vinhos brancos monovarietais e multivarietais relativamente ao radical anião superóxido, determinada por fotoquimioluminescência

A actividade anti-radicalar dos vinhos brancos relativamente ao radical anião superóxido variou entre 3,2 e 18,8 mM equivalentes de ácido ascórbico.

Apesar de algumas discrepâncias, há uma maior concordância entre os valores de actividade anti-radicalar dos vinhos brancos relativamente ao radical DPPH e ao anião radical superóxido do que entre estas actividades anti-radicalares e o poder redutor férrico.

Mais uma vez os parâmetros do processo de vinificação parecem influenciar de certo modo a actividade anti-radicalar uma vez que vinhos da mesma casta e da mesma região apresentam valores muito diferentes desta propriedade.

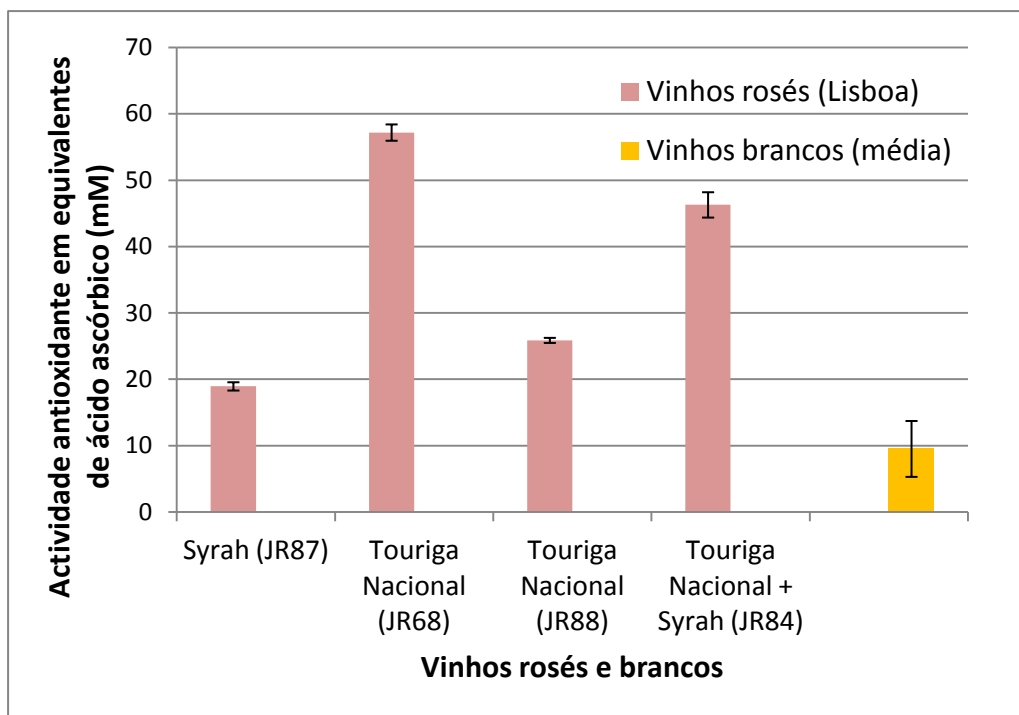


Figura 3.14 – Actividade antiradicalar de vinhos rosés relativamente ao radical anião superóxido, determinada por fotoquimioluminescência, e comparação com os valores médios desta propriedade determinados para vinhos brancos.

A actividade antiradicalar de vinhos rosés relativamente ao radical anião superóxido, determinada por fotoquimioluminescência variou entre 18,9 e 46,3 mM equivalentes de ácido ascórbico, sendo portanto 2 a 5,5 vezes superior ao valor médio obtido para vinhos brancos, tal como se verificou com os anteriores ensaios da actividade antioxidante.

Observou-se uma variabilidade mínima entre as replicadas efectuadas, comprovando que o método é adequado para estas matrizes, e destaca-se o facto de estes serem os primeiros resultados de actividade antiradicalar de vinhos brancos ou rosés relativamente ao anião superóxido que do nosso conhecimento foram obtidos.

Não foi possível realizar este ensaio em vinhos tintos, pois a utilização de vinho não diluído leva a uma saturação do meio reaccional, inibindo-se a formação de radicais durante todo o período do ensaio (2 min) o que impede a quantificação da actividade antiradicalar da amostra.

Por outro lado, foram feitas tentativas de diluir o vinho (no Reagente 1 do kit de análise, como recomendado pelo fabricante), até factores de diluição da ordem de 1:200, para tentar encontrar a concentração que não induzia a inibição total da formação de radicais. Efectivamente conseguiu-se nesta gama de diluições registar uma curva de resposta mas a curva não atingia os valores típicos de

absorvância o que indica que, apesar de se formarem radicais, a emissão de luz proveniente da reacção destes radicais com o luminol não decorre normalmente ou ocorre dispersão da luz por componentes do meio reaccional. Pensamos que esta última hipótese será a mais provável pois ao efectuar uma diluição tão elevada altera-se de tal forma a composição da amostra que poderá induzir-se a alteração de equilíbrios entre componentes do vinho conduzindo à formação de precipitados que contribuem para a dispersão da luz emitida na reacção com o luminol.

Uma observação experimental que reforça esta hipótese é o facto das determinações efectuadas com as amostras de vinho tinto diluído não só apresentarem uma curva com formato alterado mas também apresentarem grande discrepância entre replicadas.

Foi apenas encontrado um trabalho onde os autores analisam a actividade antioxidante de 20 vinhos tintos mediante este método. V. Brandolini *et al.* (2007) apresentam uma gama entre 4,9 e 11,8 mM de equivalentes de ácido gálico, que se encontra abrangida pela gama determinada por este mesmo método para os vinhos brancos analisados, e significativamente inferior à gama correspondente aos vinhos rosés. Estes resultados não são coerentes com os obtidos neste trabalho com a mesma técnica, sendo necessária a realização de mais estudos com esta técnica e esta matriz.

3.1.3 – Determinação de compostos fenólicos totais – Reacção de Folin-Ciocalteu

A quantificação dos fenólicos totais dos vinhos tintos através do método de Folin-Ciocalteu revelou uma gama de 0,681 a 3,689 g/L equivalentes de ácido gálico (Figuras 3.15 e 3.16).

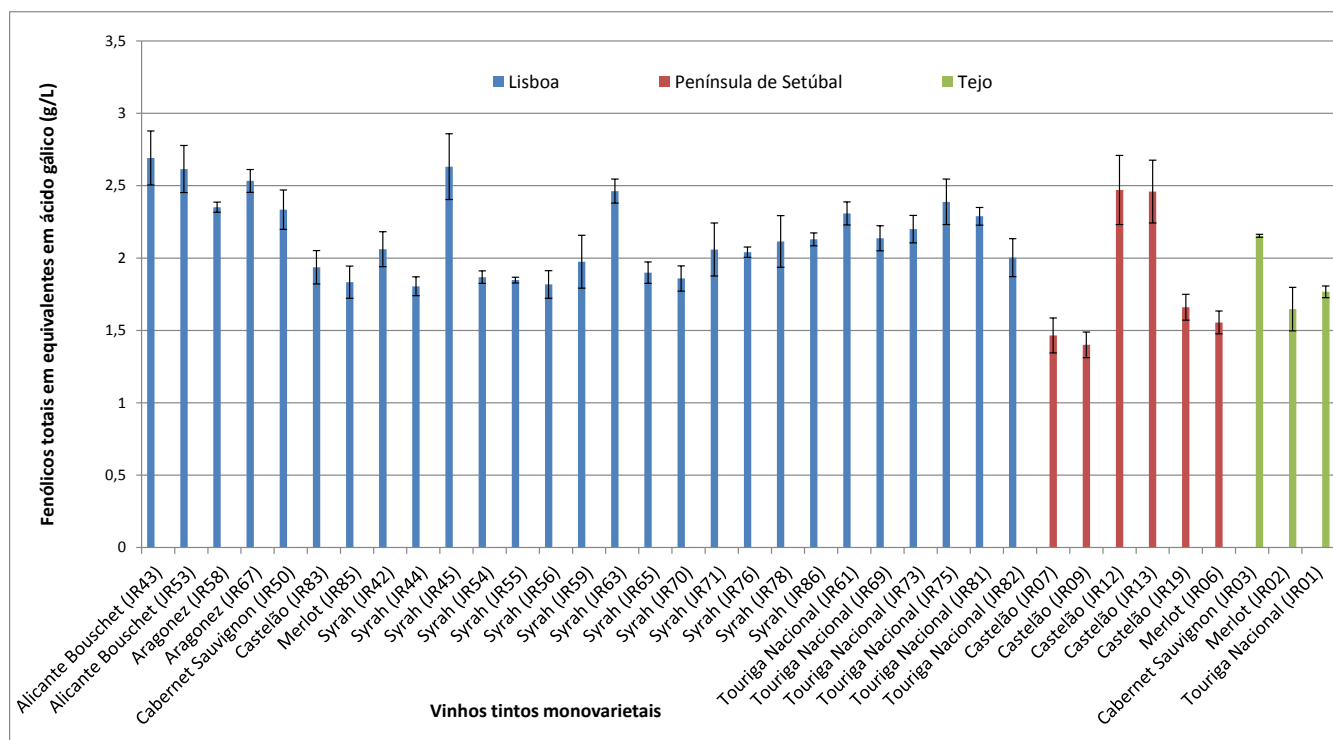


Figura 3.15 – Compostos fenólicos totais em vinhos tintos monovarietais.

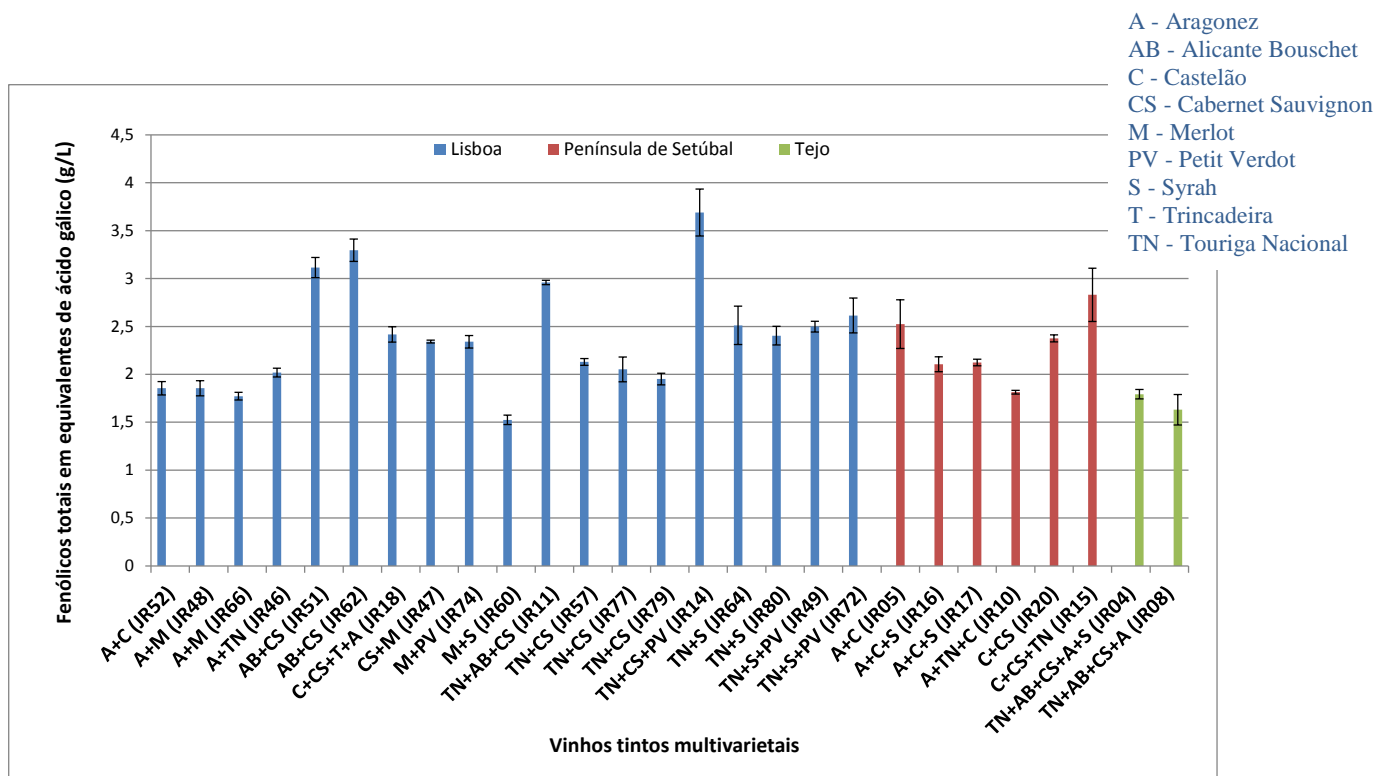


Figura 3.16 – Compostos fenólicos totais em vinhos tintos multivarietais.

O teor de compostos fenólicos dos vinhos tintos monovarietais e multivarietais apresenta um perfil com alguma semelhança com o perfil de poder redutor dos mesmos vinhos. De uma maneira geral, os valores encontrados estão em concordância com os propostos na literatura (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 – Compostos fenólicos totais de vinhos tintos

Fenólicos totais (g/L equivalentes de ácido gálico)		Autores	Ano
Mínimo	Máximo		
1,262	2,389	D. Villano <i>et al.</i>	2004
2,123	3,183	V. Katalinić <i>et al.</i>	2004
1,457	2,232	S. Pérez-Magariño & M. L. González-San José	2006
1,957		L. Bravo <i>et al.</i>	2007
1,724	1,936	N. Paixão <i>et al.</i>	2007
1,400	3,400	A. Staško <i>et al.</i>	2008
2,082	3,184	I. G. Roussis <i>et al.</i>	2008
1,775	3,014	M. D. Rivero-Pérez <i>et al.</i>	2008
2,170	2,420	C. Lorenzo <i>et al.</i>	2008
2,280	3,730	D. DiMajo <i>et al.</i>	2008
1,070	2,150	M.-I. Salaha <i>et al.</i>	2008
1,402	3,130	H. Li <i>et al.</i>	2009
3,200	5,900	A.P.S Lucena <i>et al.</i>	2010
1,147	2,984	A. Versari <i>et al.</i>	2010
1,042	1,959	D. Granato <i>et al.</i>	2010
1,244	3,188	K. Chira <i>et al.</i>	2011
1,984	2,161	I. Ginjan <i>et al.</i>	2011
1,012	3,264	M. Šeruga <i>et al.</i>	2011
0,554	2,669	I. V. Vrček <i>et al.</i>	2011
2,288	2,813	E. F. Gris <i>et al.</i>	2011

A amostra JR14 (Cabernet Sauvignon + Petit Verdot + Touriga Nacional, Lisboa, 2008) destaca-se por apresentar um maior conteúdo em fenólicos totais, não só na presente amostragem mas também nos valores propostos na bibliografia, exceptuando o teor apresentado por A.P.S. Lucena *et al.* (2010). As amostras JR51 e JR62 (Alicante Bouschet + Cabernet Sauvignon, Lisboa, 2008), dois vinhos provenientes da mesma região, do mesmo ano e produzidos a partir das mesmas castas, apresentam igualmente teores em compostos fenólicos totais elevados (superiores a 3g/L de equivalentes de ácido gálico). Este aspecto corrobora a hipótese das castas utilizadas para a produção de um vinho, assim como a região e o ano de produção afectarem a sua composição em fenólicos totais.

Os compostos fenólicos totais dos vinhos brancos foram quantificados através da reacção de Folin-Ciocalteu, obtendo-se um mínimo e um máximo de 0,059 e 0,430 g/L equivalentes de ácido gálico, respectivamente, estando os resultados apresentados nas Figura 3.15.

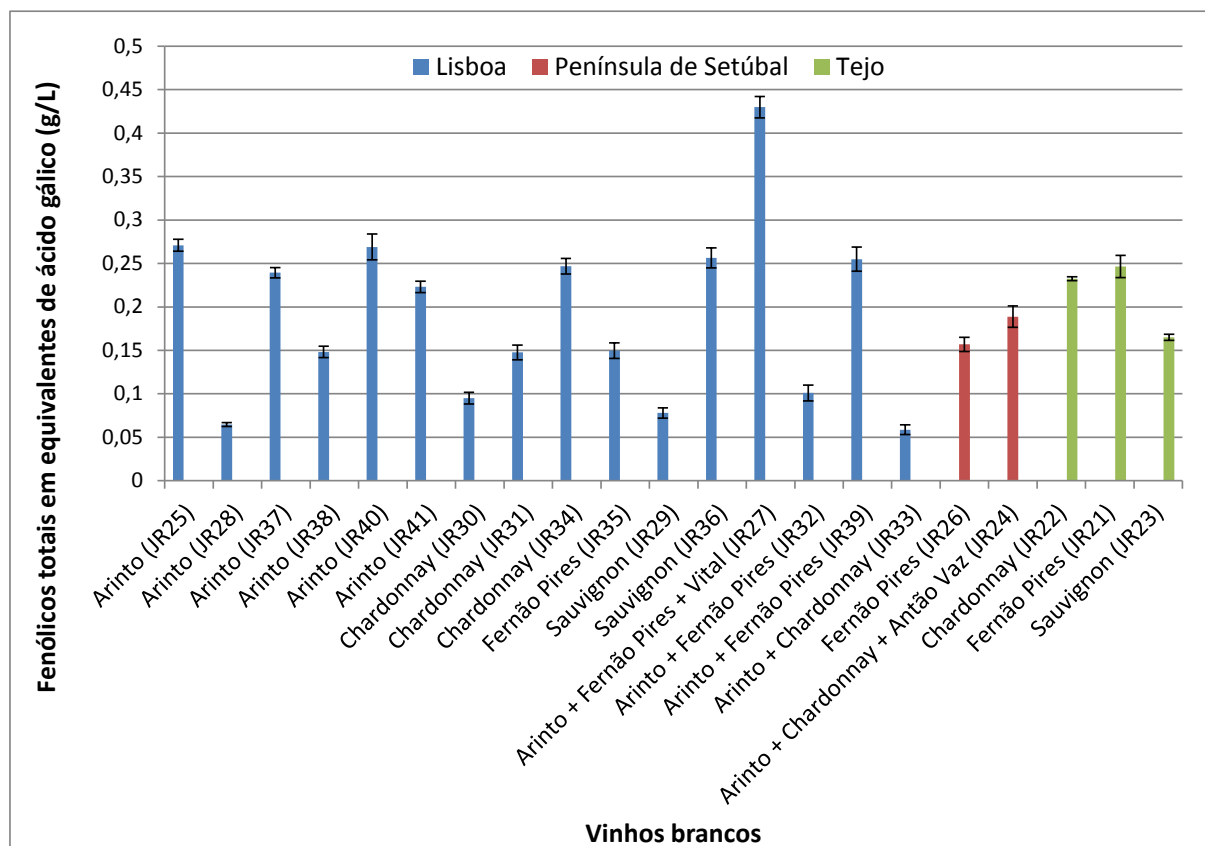


Figura 3.17 – Compostos fenólicos totais de vinhos brancos monovarietais e multivarietais.

Também no caso dos vinhos brancos monovarietais e multivarietais não se observou uma semelhança clara com os resultados de actividade antiradicalar ou de actividade redutora obtidos para os mesmos vinhos, nomeadamente não se observou uma diferença tão marcada entre os vinhos da região de Lisboa e os vinhos das regiões de Península de Setúbal e Tejo.

Das amostras analisadas, destaca-se o vinho JR27, com um valor máximo de compostos fenólicos de 0,430 g/L de equivalentes de ácido gálico. Este aspecto pode dever-se à sua composição, diferente à das outras amostras de vinho branco, tendo sido produzido não só a partir das castas Fernão Pires e Arinto, tal como as amostras JR32 e JR39, mas também a partir da casta Vital. Sendo a única amostra produzida a partir desta casta específica, a escolha das castas utilizadas para a produção dos vinhos pode revelar-se um aspecto importante para a composição em compostos fenólicos dos mesmos, no entanto, seria interessante realizar um estudo mais aprofundado onde a amostragem abrangesse mais vinhos brancos produzidos a partir da casta Vital.

O vinho branco com maior teor de fenólicos (JR27, Arinto + Fernão Pires + Vital), não é o que apresenta maior actividade anti-radicalar relativamente ao radical DPPH ou relativamente ao radical anião superóxido, nem é o vinho branco com maior poder redutor férrico.

Estes resultados sugerem que a reacção de Folin-Ciocalteu pode fornecer uma indicação geral das propriedades antioxidantes de um vinho, permitindo nomeadamente distinguir vinhos tintos de brancos mas não fornece informação relativamente a diferenças de propriedades antioxidantes entre vinhos do mesmo tipo (brancos ou tintos).

Os teores de compostos fenólicos totais encontrados nos vinhos brancos analisados encontram-se na mesma gama de valores apresentados pela bibliografia (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 – Compostos fenólicos totais de vinhos brancos

Fenólicos totais (g/L equivalentes de ácido gálico)		Autores	Ano
Mínimo	Máximo		
0,070	0,407	D. Villano <i>et al.</i>	2004
0,292	0,402	V. Katalinić <i>et al.</i>	2004
0,190		L. Bravo <i>et al.</i>	2007
0,282	0,434	N. Paixão <i>et al.</i>	2007
0,200	0,400	A. Staško <i>et al.</i>	2008
0,213	0,277	I. G. Roussis <i>et al.</i>	2008
0,231	0,279	S. Kallithraka <i>et al.</i>	2009
0,189	0,495	H. Li <i>et al.</i>	2009
0,167	0,347	I. V. Vrček <i>et al.</i>	2011

Poucos autores abordaram os estudos relativamente à actividade antioxidante em geral, e mais particularmente à composição fenólica, dos vinhos rosés. N. Paixão *et al.* (2007) e L. Bravo *et al.* (2007) propõem um teor de fenólicos totais de vinhos rosés de 0,665 e 0,414 g/L equivalentes de ácido gálico, enquanto H. Li *et al.* (2009) apresentam uma gama de 0,741 a 1,086 g/L equivalentes de ácido gálico. Os teores encontrados no presente trabalho encontram-se nesta gama de valores, sendo no entanto ligeiramente mais elevada, tendo-se obtido um mínimo e máximo respectivos de 0,681 e 1,207 g/L equivalentes de ácido gálico (Figura 3.18). É de realçar que existem diferenças significativas na composição fenólica total uma vez que o valor máximo da gama encontrada é equivalente ao dobro do valor mínimo encontrado. Um aspecto interessante é o facto das amostras JR68, correspondente ao valor máximo, e JR87, correspondente ao valor mínimo, partilharem as mesmas características em

termos de proveniência, ano de produção e castas a partir das quais foram produzidas. Mais uma vez, denota-se a importância que os métodos de vinificação aplicados a cada um dos vinhos têm na sua composição final.

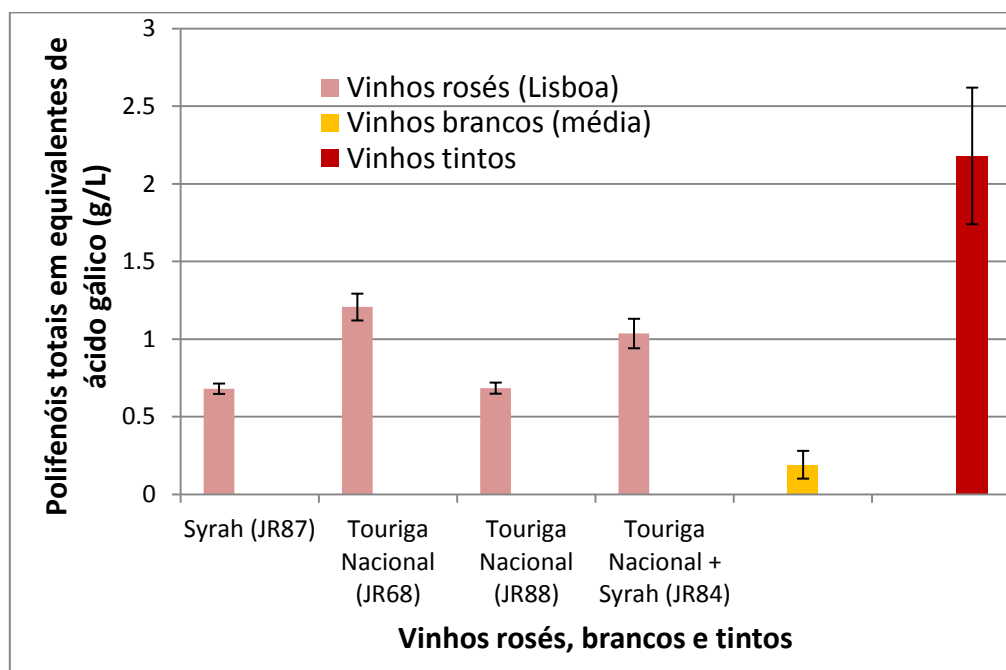


Figura 3.18 – Teor de compostos fenólicos em vinhos rosés e comparação com os valores médios encontrados em vinhos brancos e tintos

3.2 – Determinação de compostos fenólicos por HPLC-DAD

Os vinhos incluídos neste estudo foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção com vector de díodos (HPLC-DAD) em modo de varrimento total, num intervalo de 210 a 540 nm, e utilizando três canais de detecção selectivos (280, 320 e 360 nm) de forma a obter o correspondente perfil de compostos fenólicos.

A escolha da gama de varrimento total visou cobrir os comprimentos de onda máximos de absorção dos principais grupos de compostos fenólicos do vinho (Gómez-Alonso *et al.*, 2007, Munõz *et al.*, 2008), nomeadamente os ácidos hidroxibenzóicos como o ácido gálico e os flavanóis como a catequinas monoméricas a as proantocianidinas ($\lambda_{\text{max}} = 280$ nm), os ácidos hidroxicinâmicos como os ácidos cafeico ou ferúlico ($\lambda_{\text{max}} = 320$ nm), os flavonóis como a quercetina ($\lambda_{\text{max}} = 360$ nm), e as antocianinas monoméricas ($\lambda_{\text{max}} = 520$ nm).

A utilização dos canais de detecção selectivos a 280 nm, 320 nm e 360 nm, teve como objectivo isolar e maximizar a detecção dos grupos de compostos fenólicos que têm máximos da absorvância a cada um desses comprimentos de onda.

O perfil de compostos fenólicos obtido para vinhos tintos no modo de aquisição em varrimento total e um cromatograma extraído na gama de 280 nm a 370 nm que abrange os três comprimentos de onda de detecção selectiva é exemplificado na Figura 3.19.

Identificaram-se alguns compostos representativos de diversas classes de compostos fenólicos, nomeadamente o ácido gálico (ácidos hidroxibenzóicos), o ácido cafeico e o ácido ferúlico (ácidos hidroxicinâmicos), o resveratrol (stilbenos) e a quercetina (flavonóis). Estes compostos foram analisados em condições análogas às dos vinhos, de forma a poder fazer a sua identificação tentativa nas amostras, por comparação do tempo de retenção e do espectro de UV-VIS.

Os diversos vinhos analisados apresentaram perfis análogos mas com diferentes quantidades e portanto áreas cromatográficas dos diversos componentes individuais.

Os perfis de compostos fenólicos tipicamente obtidos para vinhos brancos e vinhos rosés nas mesmas gamas de comprimento de onda utilizadas para os vinhos tintos são apresentados nas Figuras 3.20 e 3.21, respectivamente.

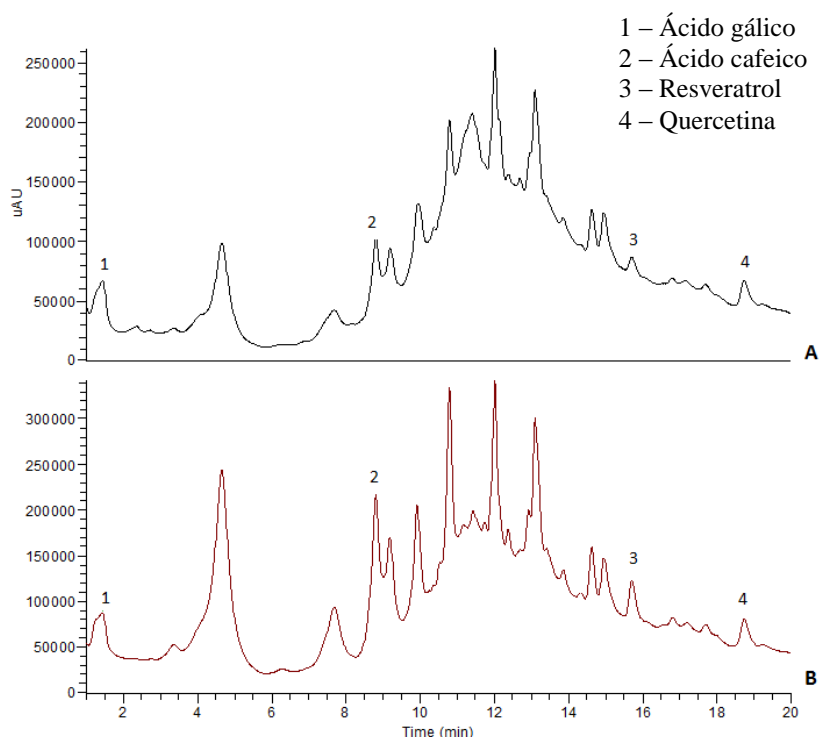


Figura 3.19 – Cromatograma obtido por injeção em HPLC-DAD de um vinho tinto (JR77), com detecção nas gamas de: a) 210 a 540 nm e b) 280 a 370

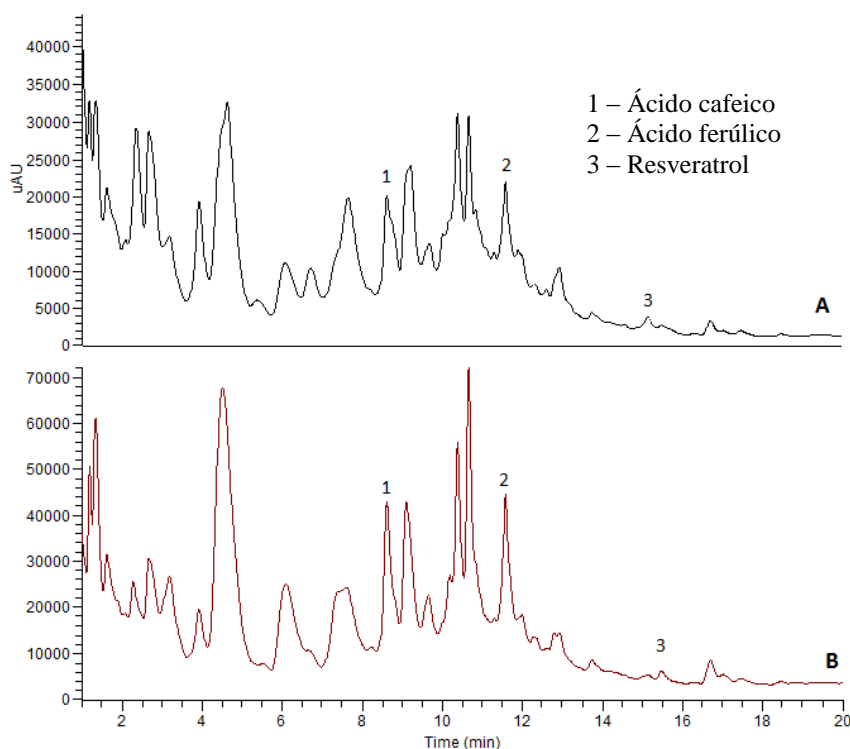


Figura 3.20 – Cromatograma obtido por injeção em HPLC-DAD de um vinho branco (JR37), com detecção nas gamas de: a) 210 a 540 nm e b) 280 a 370 nm.

Comparando as Figuras 3.19 e 3.20, observa-se que as concentrações de compostos fenólicos nos vinhos brancos são substancialmente inferiores às dos vinhos tintos, o que é coerente com os resultados obtidos na reacção de Folin-Ciocalteu e nos testes de actividade antioxidante destes dois tipos de vinho.

Por outro lado os vinhos brancos parecem ter uma maior variedade de ácidos fenólicos, nomeadamente ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos, apresentando por exemplo quantidades significativas de ácido ferúlico que não é detectado nos vinhos tintos. As diferenças entre os componentes fenólicos de vinhos têm sido abordadas por diversos autores que procuram estudar a influência das condições de vinificação (Silva *et al.*, 2005; Ivanova *et al.*, 2011), das condições geográficas e climáticas (Orduña, 2010) ou da casta e grau de maturação da uva (Conde *et al.*, 2007; Fang *et al.*, 2008).

Por outro lado, o interesse sobre a actividade antioxidante dos vinhos brancos tem vindo a crescer, encontrando-se na literatura diversos trabalhos (Rodríguez-Bernaldo de Quirós *et al.*, 2009; Pinzani *et al.*, 2010), que evidenciam que, apesar de apresentarem um menor conteúdo em compostos fenólicos totais e nomeadamente em antocianinas, os vinhos brancos contém teores importantes de ácidos fenólicos e outros componentes antioxidantes que lhes conferem um efeito biológico significativo.

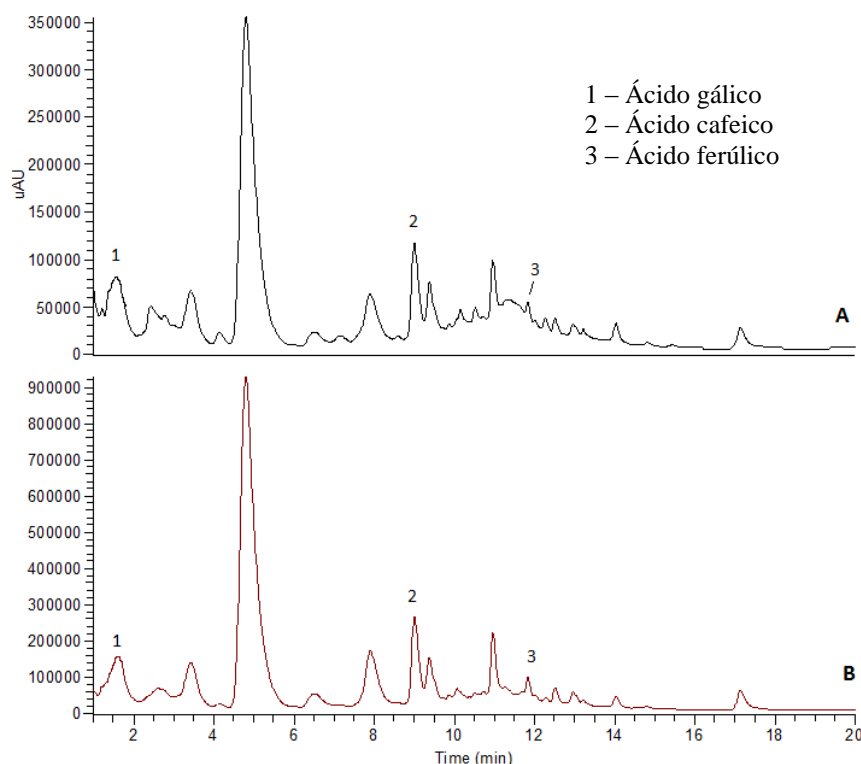


Figura 3.21 – Cromatograma obtido por injeção em HPLC-DAD de um vinho rosé (JR88), com detecção nas gamas de: a) 210 a 540 nm e b) 280 a 370 nm.

Os vinhos rosés apresentaram perfis de fenólicos com concentrações de diversos compostos fenólicos comparáveis às dos vinhos tintos mas apresentando componentes como o ácido ferúlico, que se encontram tipicamente nos vinhos brancos.

Observou-se a presença de um pico cromatográfico de grande área num tempo de retenção de cerca de 5 minutos, que foi predominante nos vinhos rosés, com uma área menor nos vinhos tintos e menor ainda nos vinhos brancos. A concentração deste composto não varia de forma análoga aos restantes componentes do perfil de fenólicos para estes três tipos de vinho e de forma coerente com as propriedades antioxidantes dos vinhos analisados pelo que se considerou que este componente poderá não contribuir para o potencial antioxidante das diferentes amostras.

Quanto aos restantes componentes fenólicos presentes no perfil cromatográfico, registaram-se, nos vinhos tintos, concentrações ligeiramente superiores às dos vinhos rosés, e cerca de 5 vezes superiores às dos vinhos brancos.

Se considerarmos a detecção selectiva a 280 nm, 320 nm e 360 nm, e efectuarmos o somatório das áreas dos picos cromatográficos detectados nesses comprimentos de onda específicos obtemos um parâmetro numérico que deve reflectir o teor global dos compostos com máximos de absorção em

cada um desses comprimentos de onda e portanto permite comparar esses teores entre as diferentes amostras.

Na Figura 3.22 apresentam-se as áreas cromatográficas totais de compostos fenólicos com máximo de absorção a 280 nm (ácidos hidroxibenzóicos e flavanóis) para os vinhos tintos monovarietais e multivarietais incluídos neste estudo.

A casta Alicante Bouschet parece estar associada a maiores concentrações de derivados benzóicos e catequinas monoméricas tanto em vinhos monovarietais (JR43 e JR53), bem como em vinhos multivarietais (JR51 e JR62), no entanto as condições de vinificação parecem ter grande impacto nos teores destes compostos como se pode deduzir pelos níveis apresentados nos vinhos monovarietais JR45 (Syrah) da região de Lisboa e JR01 (Touriga Nacional) da região Tejo, bastante superiores aos de outros vinhos da mesma casta e região.

Não se observam diferenças evidentes entre vinhos das três regiões consideradas, dentro das limitações inerentes à amostragem realizada, parecendo ser sobretudo a casta e as condições de vinificação os parâmetros mais influenciadores do teor de compostos fenólicos detectados selectivamente a 280 nm.

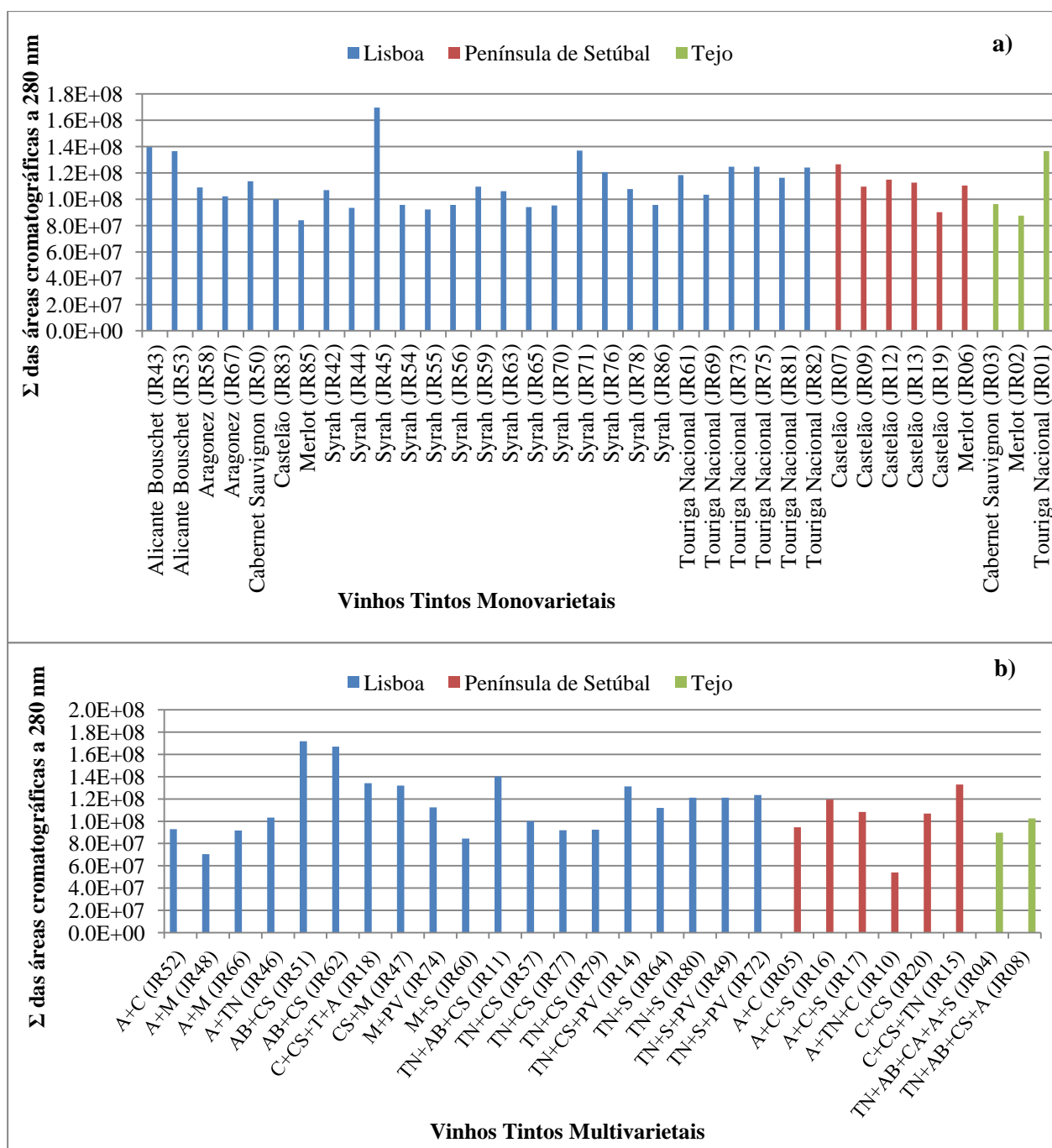


Figura 3.22 – Áreas cromatográficas totais de compostos fenólicos com máximo de absorção a 280 nm (ácidos hidroxibenzóicos e flavanóis) para os vinhos tintos a) monovarietais e b) multivarietais das regiões de Lisboa, Península de Setúbal e Tejo

As áreas cromatográficas totais dos compostos fenólicos com máximo de absorção a 280 nm presentes nos vinhos brancos monovarietais e multivarietais são apresentadas na Figura 3.23.

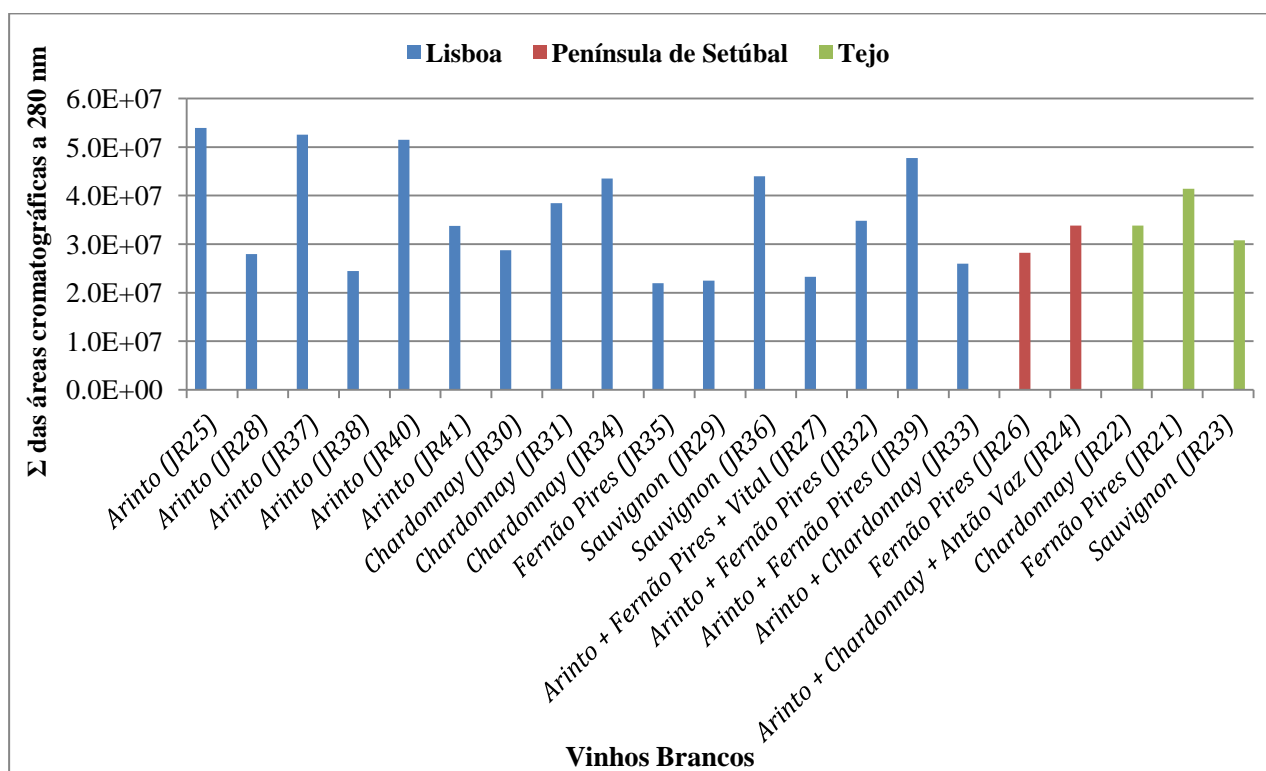


Figura 3.23 – Áreas cromatográficas totais de compostos fenólicos com máximo de absorção a 280 nm (ácidos hidroxibenzóicos e flavanóis) para os vinhos brancos das regiões de Lisboa, Península de Setúbal e Tejo

No caso dos vinhos brancos não se encontra uma distinção clara no teor global de compostos que absorvem a 280 nm, entre uma determinada casta e as restantes, pelo contrário evidencia-se a grande influência do processo de produção na extracção deste tipo de compostos fenólicos em vinhos brancos, obtendo-se valores de áreas cromatográficas a 280 nm que são metade das obtidas para vinhos brancos da mesma casta e região (JR25, JR28, JR37, JR38).

Na Figura 3.24 apresentam-se as áreas cromatográficas totais de compostos fenólicos com máximo de absorção a 320 nm (ácidos hidroxicinâmicos e stilbenos) para os vinhos tintos estudados.

Os ácidos hidroxicinâmicos são compostos fenólicos não flavonóides cuja actividade antioxidante tem sido realçada por diversos autores (Gülçin, 2006; Mitić *et al.*, 2010); também os stilbenos têm sido estudados pela sua importância para as propriedades biológicas dos vinhos (Sun *et al.*, 2006), e em particular o resveratrol tem sido um componente fenólico destacado pela variedade de actividades biológicas e por existir particularmente no vinho (Fernández-Mar *et al.*, 2012).

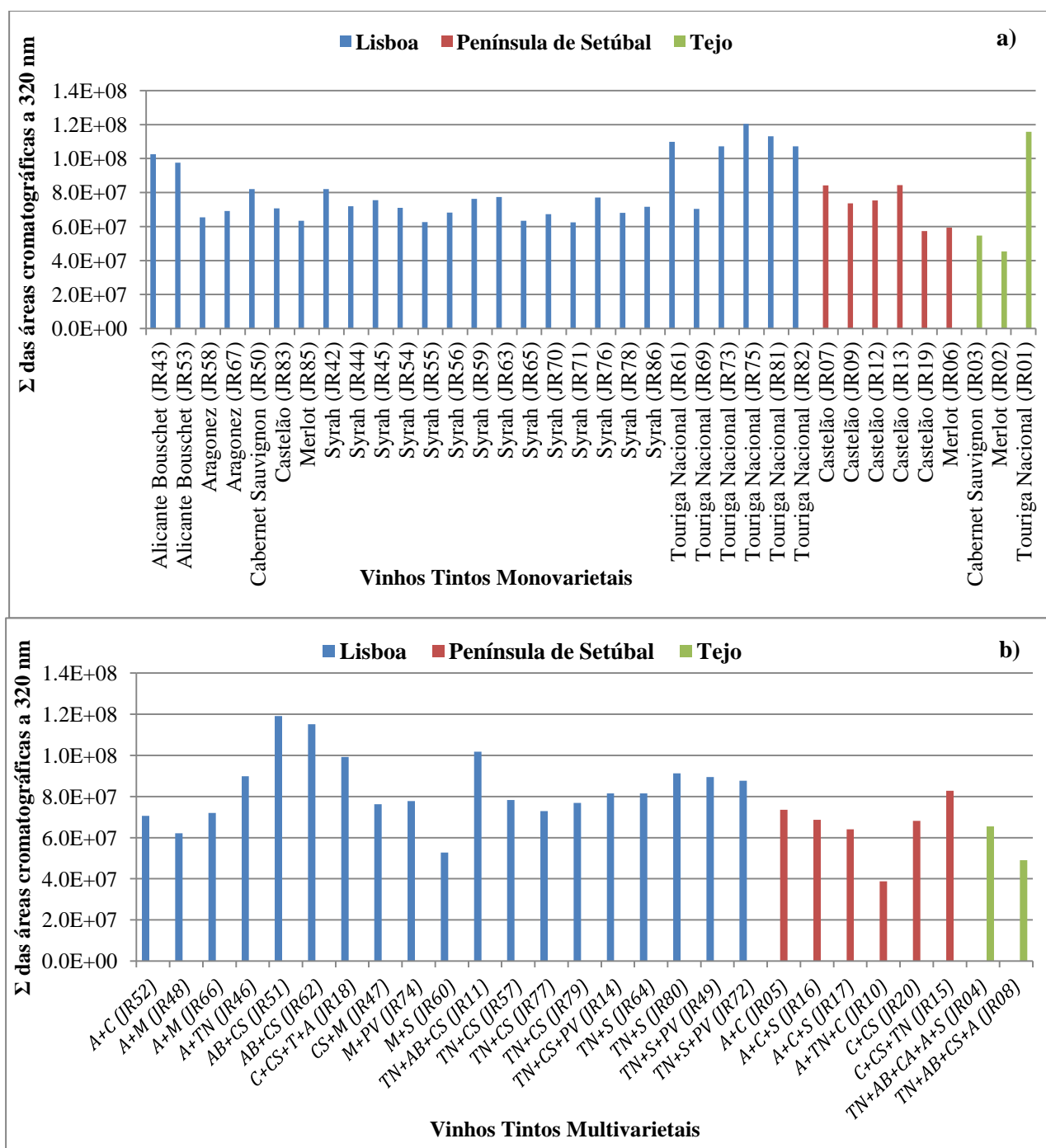


Figura 3.24 – Áreas cromatográficas totais de compostos fenólicos com máximo de absorção a 320 nm (ácidos hidroxicinâmicos e stilbenos) para os vinhos tintos a) monovarietais e b) multivarietais das regiões de Lisboa, Península de Setúbal e Tejo

Nos vinhos tintos monovarietais as castas Alicante Bouschet e Touriga Nacional destacam-se pelo elevado teor de ácidos hidroxicinâmicos e stilbenos quando comparadas com as restantes castas. Este efeito é também observável nos vinhos tintos multivarietais, no caso da casta Alicante Bouschet mas de forma menos evidente no caso da casta Touriga Nacional; esta casta surge frequentemente em

vinhos tintos multivarietais, misturada com mais do que uma outra casta e em proporções não conhecidas pelo que o seu impacto no perfil fenólico final do vinho é naturalmente mais variável.

As áreas cromatográficas totais dos compostos fenólicos com máximo de absorção a 320 nm, presentes em vinhos brancos monovarietais e multivarietais são apresentadas na Figura 3.25.

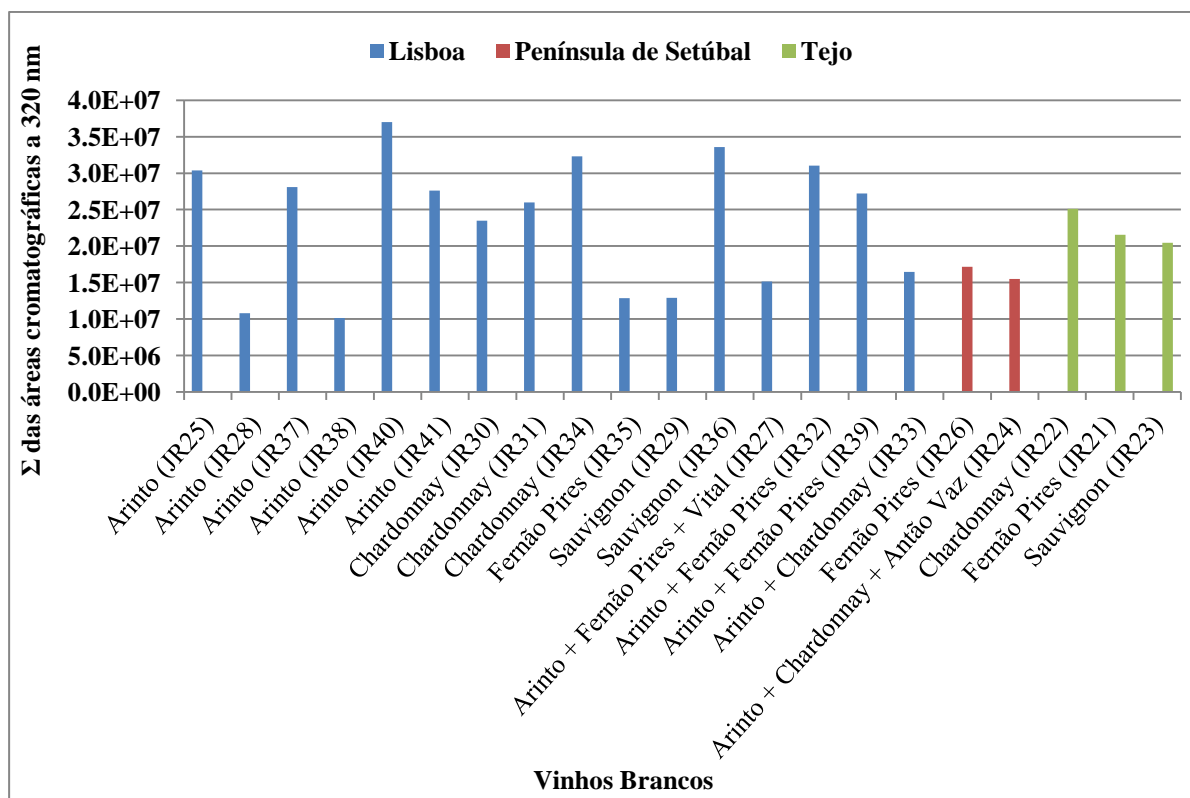


Figura 3.25 – Áreas cromatográficas totais de compostos fenólicos com máximo de absorção a 320 nm (ácidos hidroxicinâmicos e stilbenos) para os vinhos brancos das regiões de Lisboa, Península de Setúbal e Tejo.

O somatório das áreas cromatográficas a 320 nm para os vinhos brancos apresenta um perfil quase coincidente com o perfil das áreas cromatográficas a 280 nm mas com valores de área cerca de metade dos obtidos a 280 nm. Constatase portanto que o teor de ácidos benzóicos e flavanóis presentes nos vinhos brancos é cerca do dobro do teor em ácidos hidroxicinâmicos e stilbenos e que ambas as classes de componentes parecem ser mais afectadas por parâmetros de processo como maturação da uva ou métodos de vinificação do que pela casta utilizada na fabricação do vinho.

Os vinhos brancos apresentam concentrações globais de ácidos hidroxicinâmicos e stilbenos duas a oito vezes inferiores às dos vinhos tintos, mas são ricos em alguns compostos fenólicos particulares como o ácido ferúlico, que lhes conferem propriedades funcionais específicas.

O somatório das áreas cromatográficas dos cromatogramas extraídos a 360 nm, para vinhos tintos monovarietais e multivarietais reflecte o teor destes vinhos em flavonóis, compostos fenólicos com

uma estrutura flavonóide, como por exemplo a quercetina (Figura 3.26). Estes compostos estão presentes em concentrações cerca de quatro vezes inferiores às concentrações dos compostos fenólicos com máximos de absorção a 280 nm e a 320 nm, tanto nos vinhos tintos como nos vinhos brancos.

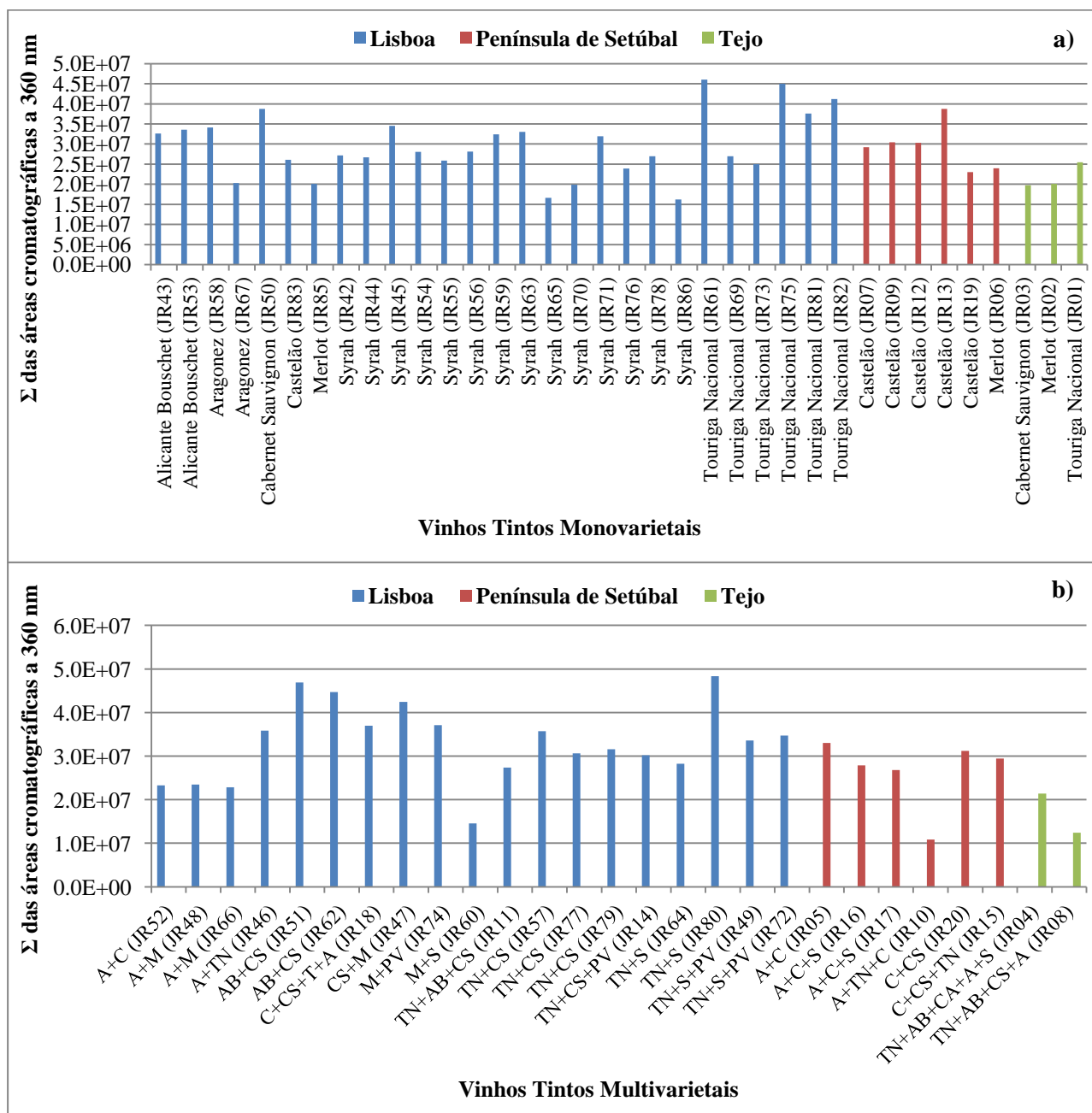


Figura 3.26 – Áreas cromatográficas totais de compostos fenólicos com máximo de absorção a 360 nm (flavonóis) para os vinhos tintos a) monovarietais e b) multivarietais das regiões de Lisboa, Península de Setúbal e Tejo.

As castas que se destacam no teor de flavonóis dos vinhos tintos são Alicante Bouschet, Touriga Nacional e Cabernet Sauvignon. Essa distinção é mais evidente em vinhos monovarietais do que em vinhos multivarietais tal como se verificou com os ácidos hidroxicinâmicos e os stilbenos.

Os vinhos tintos da região Tejo apresentaram teores globais de flavonóis substancialmente inferiores aos restantes mas dado o número reduzido de amostras (duas), não podemos concluir ser uma tendência regional.

O teor global de flavonóis em vinhos brancos é representado na Figura 3.27 para os vários vinhos brancos estudados.

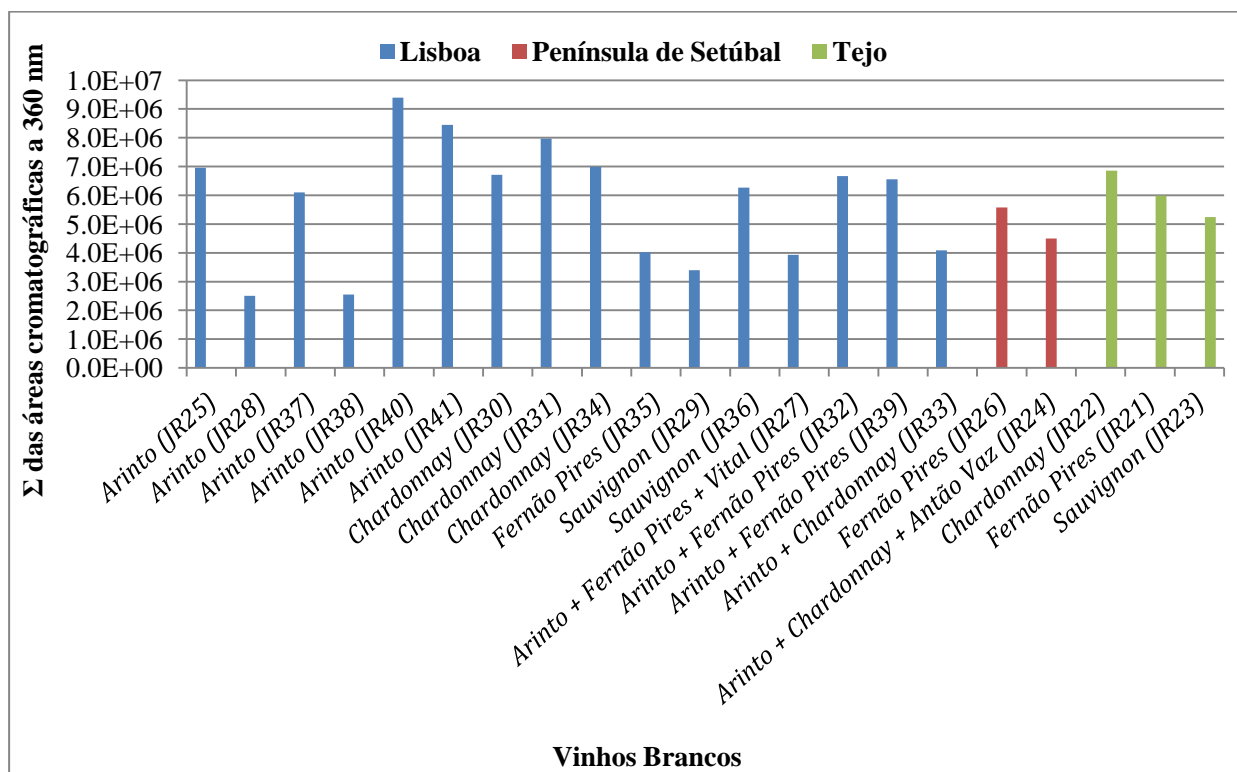


Figura 3.27 – Áreas cromatográficas totais de compostos fenólicos com máximo de absorção a 360 nm (flavonóis) para os vinhos brancos das regiões de Lisboa, Península de Setúbal e Tejo.

Como se pode observar, registam-se diferenças substanciais no teor de flavonóis entre vinhos brancos monovariais da mesma casta e da mesma região, tal como já se tinha verificado com as outras categorias de compostos fenólicos, evidenciando, entre outros, a importância dos parâmetros do processo de produção no teor de fenólicos dos vinhos brancos.

A casta Chardonnay pareceu ser a mais associada a teores elevados de compostos fenólicos apesar de esta tendência requerer confirmação por análise de um maior número de amostras.

Os resultados obtidos na análise do perfil de fenólicos informam acerca da possível importância de processos de vinificação nas características funcionais dos vinhos pelo que a comparação do contributo das diferentes castas deve ser feito tendo em conta os parâmetros de produção, especialmente no caso dos vinhos brancos.

O maior contacto do mosto com as massas que ocorre durante a produção dos vinhos tintos justifica o facto de se obterem resultados mais homogêneos para cada casta pois a transferência de compostos fenólicos é mais intensa sobrepondo-se a diferenças no processo produtivo.

Alguns compostos representativos das várias classes de compostos fenólicos estudadas por HPLC-DAD, foram seleccionados para quantificação nas amostras de vinhos brancos, tintos e rosés incluídas neste trabalho: o ácido gálico (ácidos hidroxibenzoicos), resveratrol (stilbenos), ácidos cafeico e ferúlico (ácidos hidroxicinâmicos) e quercetina (flavonóis).

Foram extraídos cromatogramas a comprimentos de onda selectivos correspondentes aos máximos de absorvância de cada um dos compostos estudados: 270 nm (ácido gálico), 306 nm (trans-resveratrol), 320 nm (ácido cafeico), 323 nm (ácido ferúlico) e 370 nm (quercetina).

Efectuou-se o traçado de rectas de calibração para cada um destes padrões em gamas compatíveis com a sua concentração nos diferentes tipos de vinho, tendo-se obtido relações lineares com coeficientes de correlação entre 0,9979 e 0,9999 (Tabela 3.6).

Tabela 3.6 – Gamas de trabalho, equações e coeficientes de correlação das rectas de calibração construídas para os padrões de compostos fenólicos quantificados

Composto	Gama de trabalho (mg/L)	Equação da recta	Coefficiente de correlação, R
Ácido gálico	5 - 100	$y = 20582x + 67625$	0,9999
Ácido cafeico	5 - 100	$y = 26231x + 35183$	0,9999
Ácido ferúlico	0,5 - 5	$y = 48697x - 11946$	0,9979
trans-Resveratrol	5 - 50	$y = 53292x - 1000000$	0,9982
Quercetina	1 - 20	$y = 26201x + 15852$	0,9979

A determinação dos limites de detecção e dos limites de quantificação de cada composto foi efectuada através do método de cálculo do desvio padrão residual das rectas de calibração (Tabela 3.7), tendo-se registado valores de limites de detecção entre 0,0003 e 0,0163.

Tabela 3.7 – Limites de detecção e de quantificação determinados no presente trabalho

Composto	Limite de Detecção (mg/L)	Limite de Quantificação (mg/L)
Ácido gálico	0,0163	0,0494
Ácido cafeico	0,0074	0,0224
Ácido ferúlico	0,0054	0,0163
trans-Resveratrol	0,0003	0,0009
Quercetina	0,0019	0,0057

Os limites de detecção e de quantificação destes compostos, quando disponíveis na literatura (Tabela 3.8) apresentam valores bastante distintos e geralmente superiores aos determinados no presente

trabalho; exceptuam-se os valores apresentados por L. Paulo *et al.* (2011) que são cerca de dez vezes inferiores aos aqui apresentados.

Tabela 3.8 – Limites de detecção e de quantificação para alguns compostos fenólicos

Composto	Limite de Detecção (mg/L)	Limite de Quantificação (mg/L)	Autores	Ano
Ácido gálico	0,711	2,370	S. Gómez-Alonso <i>et al.</i>	2007
	1,3	-	M. Šeruga <i>et al.</i>	2011
	0,005	0,020	E. Porgalı & E. Büyüktuncel	2012
Ácido cafeico	0,099	0,331	S. Gómez-Alonso <i>et al.</i>	2007
	0,3	-	Q. Liu <i>et al.</i>	2008
	0,3	-	M. Šeruga <i>et al.</i>	2011
	0,010	0,020	E. Porgalı & E. Büyüktuncel	2012
Ácido ferúlico	0,147	0,491	S. Gómez-Alonso <i>et al.</i>	2007
trans-Resveratrol	0,002	0,007	S. Kallithraka <i>et al.</i>	2001
	0,06	-	N. Ratola <i>et al.</i>	2004
	0,154	0,515	S. Gómez-Alonso <i>et al.</i>	2007
	0,02	-	A. Rodríguez-Bernaldo de Quirós <i>et al.</i>	2009
	0,000023	0,000023	L. Paulo <i>et al.</i>	2011
	0,020	0,100	E. Porgalı & E. Büyüktuncel	2012
Quercetina	0,152	0,506	S. Gómez-Alonso <i>et al.</i>	2007
	0,0162	-	F. Fang <i>et al.</i>	2007
	0,2	-	A. Rodríguez-Bernaldo de Quirós <i>et al.</i>	2009
	0,5	-	M. Šeruga <i>et al.</i>	2011
	0,005	0,020	E. Porgalı & E. Büyüktuncel	2012

Recorrendo a estas rectas de calibração e às áreas cromatográficas de cada um destes compostos nas várias amostras, calcularam-se os teores de ácido gálico, ácido cafeico, ácido ferúlico, trans-resveratrol, quercetina nos vinhos tintos, brancos e rosés onde estes compostos fenólicos foram detectados. O ácido gálico foi o componente encontrado em maior concentração de entre os cinco quantificados, atingindo concentrações superiores a 100 mg/L, seguindo-se o ácido cafeico e a quercetina com concentrações na gama de 10 a 30 mg/L e finalmente o ácido ferúlico e o resveratrol com concentrações inferiores a 2 mg/L. As concentrações destes compostos em vinhos tintos de diferentes proveniências, diferentes castas e diferentes anos de produção são apresentadas na Tabela 3.9.

Tabela 3.9 – Teor de compostos fenólicos individuais em vinhos tintos.

Composto	Valor mínimo (mg/L)	Valor máximo (mg/L)	Autores	Ano
Ácido gálico	39	61	M. Castellari <i>et al.</i>	2002
	13,25	16,39	G. Özkan & GöktürkBaydar	2006
	38	150	A. Stäsko <i>et al.</i>	2008
	15,63	24,47	S. Gómez-Alonso <i>et al.</i>	2007
	10,30	25,69	J. Woraratphoka <i>et al.</i>	2007
	9,0	23,0	F. Alén-Ruiz <i>et al.</i>	2009
	17,77	41,90	Z. Li <i>et al.</i>	2011
	3,17	37,30	I.V. Vrček <i>et al.</i>	2011
	51,2	179,4	M. Šeruga <i>et al.</i>	2011
	6,01	10,90	M.J. Cejudo-Bastante <i>et al.</i>	2011
	44,1	54,8	I. Ginjon <i>et al.</i>	2011
Ácido cafeico	24,07	50,89	E. Porgalı & E. Büyüktuncel	2012
	2,2	8,7	M. Castellari <i>et al.</i>	2002
	5,92	23,58	G. Özkan & GöktürkBaydar	2006
	1,58	13,74	J. Woraratphoka <i>et al.</i>	2007
	9	27	A. Stäsko <i>et al.</i>	2008
	20,6	72,0	F. Alén-Ruiz <i>et al.</i>	2009
	2,02	17,28	Z. Li <i>et al.</i>	2011
	2,23	3,48	I.V. Vrček <i>et al.</i>	2011
	3,2	18,6	M. Šeruga <i>et al.</i>	2011
	15,2	29,9	M.J. Cejudo-Bastante <i>et al.</i>	2011
	5,3	7,6	I. Ginjon <i>et al.</i>	2011
trans-Resveratrol	0,96	3,67	E. Porgalı & E. Büyüktuncel	2012
	ND	5,7	Ribeiro de Lima <i>et al.</i>	1999
	ND	5,43	Souto <i>et al.</i>	2000
	0,508	2,534	S. Kallithraka <i>et al.</i>	2001
	0,2	1,5	M. Castellari <i>et al.</i>	2002
	0,47	1,24	N. Ratola <i>et al.</i>	2004
	0,02	0,18	S. Gómez-Alonso <i>et al.</i>	2007
	0,311	4,403	O. Gürbüz <i>et al.</i>	2007
	ND	2,76	J. Woraratphoka <i>et al.</i>	2007
	2,0	4,0	F. Alén-Ruiz <i>et al.</i>	2009
	0,92	13,96	F. Dias <i>et al.</i>	2009
	0,76	6,75	A.P.S. Lucena <i>et al.</i>	2010
	0,05	10,87	L. Paulo <i>et al.</i>	2011
	0,49	10,94	I.V. Vrček <i>et al.</i>	2011
	0,40	3,62	Z. Li <i>et al.</i>	2011
	ND	2,8	I. Ginjon <i>et al.</i>	2011
	36,1	44,1	G.C. Tenore <i>et al.</i>	2011
	0,35	4,85	M. Atanacković <i>et al.</i>	2012
Quercetina	0,31	0,97	E. Porgalı & E. Büyüktuncel	2012
	3,5	6,2	M. Castellari <i>et al.</i>	2002
	2,20	3,87	G. Özkan & GöktürkBaydar	2006
	ND	3,74	J. Woraratphoka <i>et al.</i>	2007
	0,06	2,65	F. Fang <i>et al.</i>	2007
	0,338	1,381	D.DiMajo <i>et al.</i>	2008
	0,025		A. Kuman <i>et al.</i>	2009
	0,23	6,05	A.P.S. Lucena <i>et al.</i>	2010
	0,20	4,12	I.V. Vrček <i>et al.</i>	2011
	0,06	0,19	Z. Li <i>et al.</i>	2011
	1,2	7,0	M. Šeruga <i>et al.</i>	2011
	1,2	15,7	I. Ginjon <i>et al.</i>	2011
	0,42	1,04	M.J. Cejudo-Bastante <i>et al.</i>	2011
	0,60	4,65	E. Porgalı & E. Büyüktuncel	2012

Estas diferenças não implicam que os compostos mais concentrados sejam mais determinantes na actividade antioxidante dos vinhos que os contém, pois estes compostos apresentam diferentes actividades específicas em ensaios *in vitro* (Itagaki *et al.*, 2009; Casagrande *et al.*, 2007, Ji *et al.*, 2006).

Neste trabalho encontraram-se teores de ácido gálico entre 26,9 mg/L e 127,7 mg/L nos vinhos tintos monovarietais entre 34,1 e 152,1 mg/L nos vinhos tintos multivarietais (Figura 3.28), valores comparáveis com os encontrados por A. Stäsko *et al.* (2008) e M. Šeruga *et al.* (2011). Os restantes autores que quantificaram o ácido gálico nos vinhos tintos obtiveram valores bastante mais baixos, assim como gamas mais curtas (Tabela 3.9).

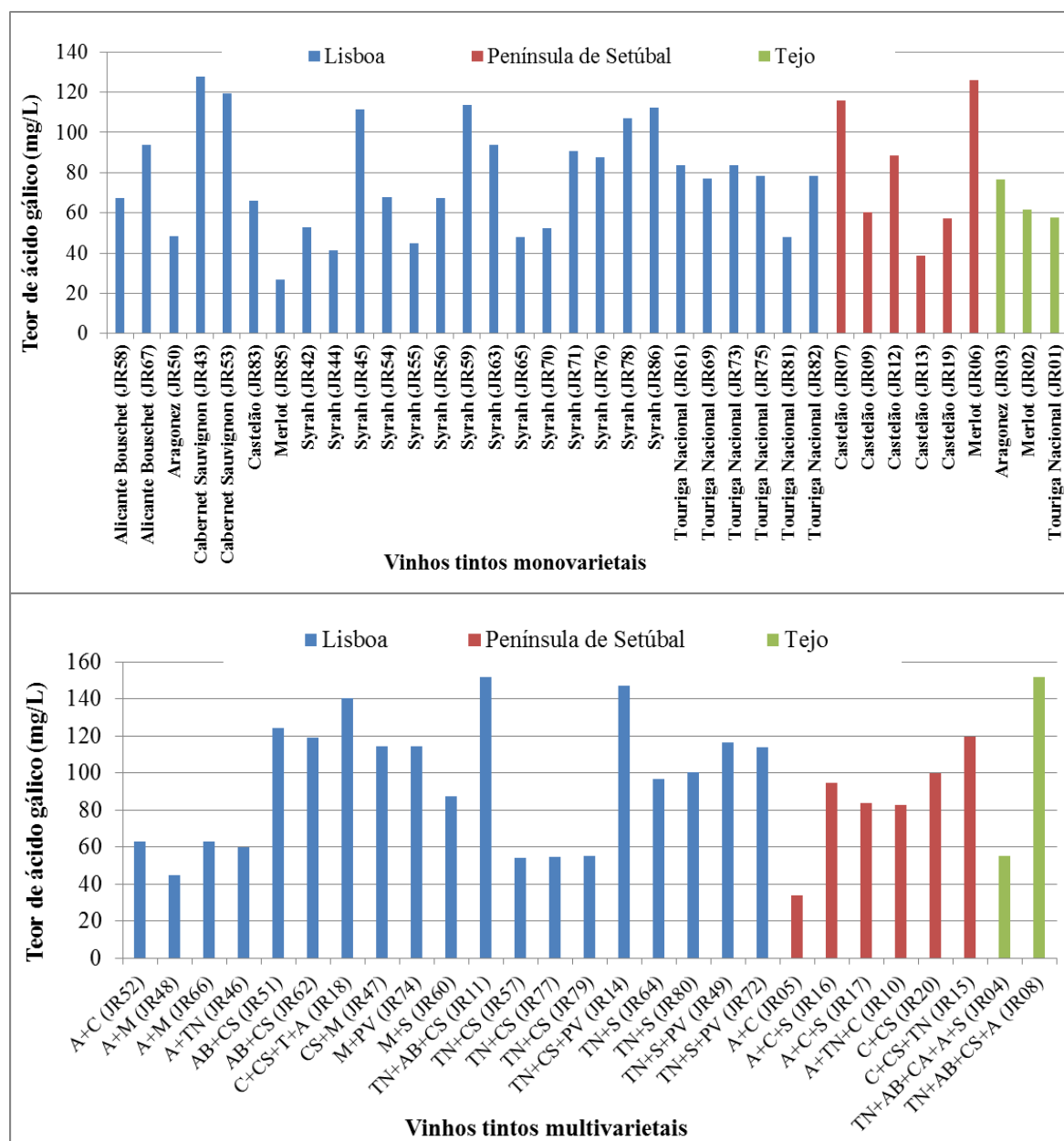


Figura 3.28 – Teor de ácido gálico em vinhos tintos monovarietais e multivarietais.

As castas Cabernet Sauvignon e Petit Verdot parecem estar associadas a um maior teor de ácido gálico, mas o mesmo não se pode afirmar em relação a outras castas como Castelão ou Syrah que deram origem a vinhos com teores de ácido gálico muito variáveis. As amostras JR08 e JR11 apresentaram uma elevada quantidade de ácido gálico (cerca de 152 mg/L), destacando-se das restantes amostras. Não foi detectada uma diferença acentuada entre o teor de ácido gálico de vinhos tintos das diferentes regiões consideradas, quer no caso dos vinhos monovarietais e multivarietais.

O teor de ácido cafeico nos vinhos tintos variou entre 3,01 mg/L e 49,93 mg/L (Figura 3.29) valores comparáveis aos encontrados na literatura excepto F. Alén-Ruiz *et al.*, que registaram um valor máximo de 72 mg/L para este composto (Tabela 3.9).

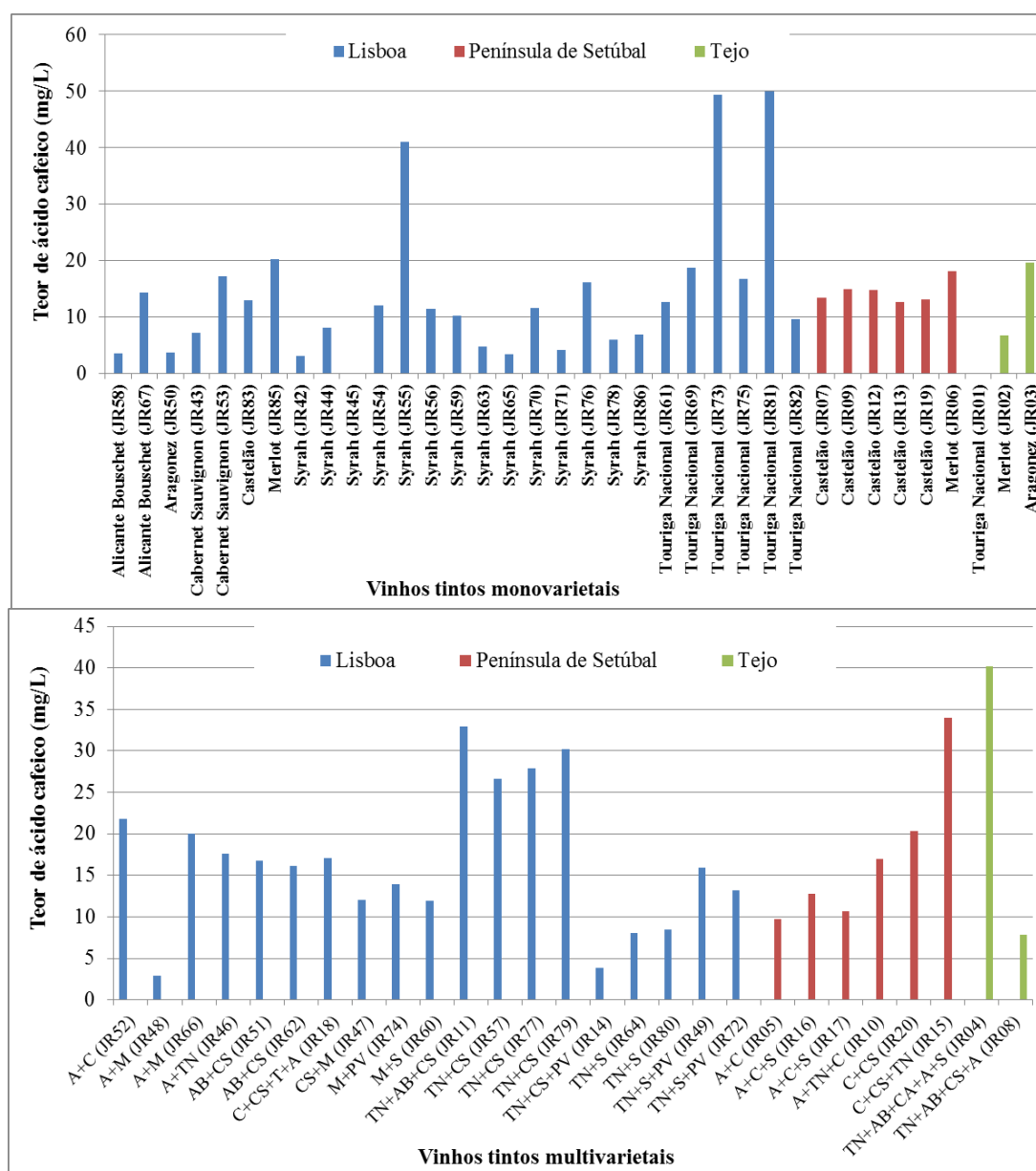


Figura 3.29 – Teor de ácido cafeico em vinhos tintos monovarietais e multivarietais.

A amostra JR01 apresentou um teor excepcionalmente elevado de ácido cafeico (valor não apresentado, cerca de 179 mg/L), devendo-se provavelmente à co-eluição com outro composto durante a corrida cromatográfica, uma vez que este vinho não apresenta valores superiores à média nos diferentes ensaios de determinação antioxidante realizados.

Nos vinhos monovarietais tintos da região de Lisboa destacam-se as amostras JR55 (Syrah) e JR73 e JR81 (Touriga Nacional), com um teor em ácido cafeico superior a 40 mg/L. Outras amostras das mesmas castas e região apresentam teores muito inferiores de ácido cafeico, inferiores a 20mg/L, tal como acontece com os vinhos monovarietais tintos das regiões Tejo e Península de Setúbal. Tendo em conta que entre os factores que afectam a composição final dos vinhos o único acerca do qual não se possui informação é o método de vinificação, poderia sugerir-se que este factor afecta decisivamente o teor de ácido cafeico.

De uma maneira geral, os vinhos tintos monovarietais apresentam teores de ácido cafeico inferiores aos vinhos tintos multivarietais, tal como observado no caso do ácido gálico.

As diferenças no teor de ácido cafeico entre vinhos da mesma casta e região é mais pronunciada no caso do ácido cafeico do que no caso do ácido gálico o que pode indiciar uma maior sensibilidade deste componente a parâmetros de produção como a temperatura, o tempo de contacto das massa com o mosto, o pH, entre outros.

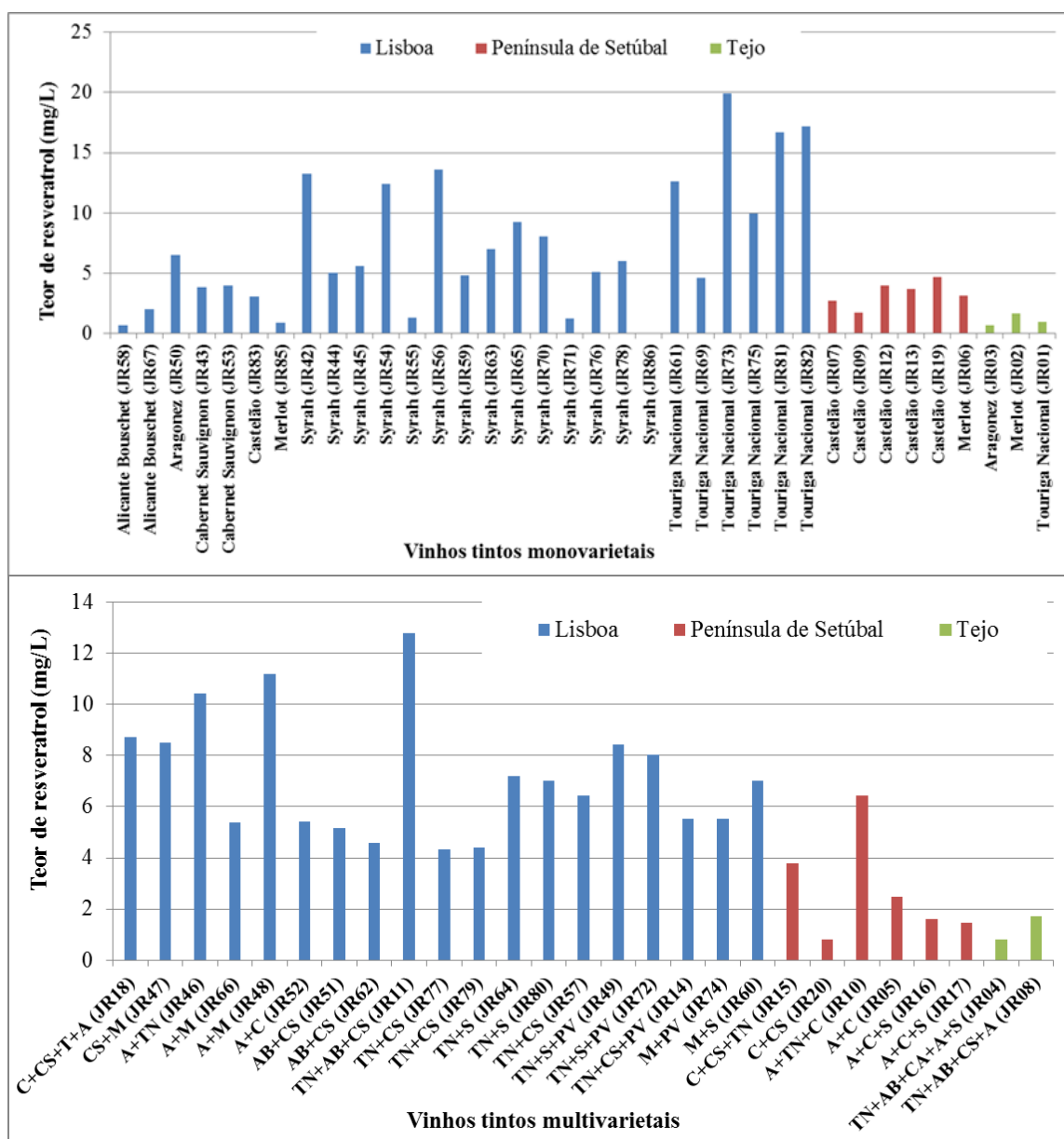


Figura 3.30 – Teor de resveratrol em vinhos tintos monovarietais e multivarietais.

Os vinhos tintos analisados apresentaram teores de resveratrol entre 0,72 e 17,18 mg/L (Figura 3.30), correspondendo os valores mais elevados a vinhos monovarietais da região de Lisboa e da casta Touriga Nacional.

De maneira geral, o conteúdo em resveratrol das amostras analisadas é superior aos teores apresentados na literatura (Tabela 3.9), excepto os valores propostos por G.C. Tenore *et al.* (2011) que são muito superiores aos restantes autores e aos encontrados no presente trabalho. Destacam-se as amostras JR73, JR81 e JR82 cujo teor neste composto é superior a 15 mg/L, excedendo assim o teor máximo proposto por F. Dias *et al.* (2009). Estas três amostras são provenientes da mesma região e foram produzidas a partir da mesma casta, Touriga Nacional, sendo que as duas primeiras foram produzidas no mesmo ano. Este aspecto permite concluir que o solo e a casta utilizada para a produção

da uva têm uma forte influência na composição nos diferentes compostos fenólicos do vinho, resultados que estão de acordo com o trabalho realizado por M. Atanacković *et al.* (2011).

Relativamente à região vitivinícola, os vinhos produzidos na região de Lisboa apresentam, de maneira geral, teores em resveratrol superiores aos vinhos produzidos tanto na Península de Setúbal como no Tejo, independentemente do facto de se tratar de vinhos mono ou multivarietais. Estas diferenças de composição acompanham as diferenças na actividade redutora férrica e actividade antiradicalar também observadas entre as amostras das três regiões vitivinícolas consideradas.

A casta Alicante Bouschet que apresentou teores elevados de outros compostos fenólicos apresenta em relação ao resveratrol valores significativamente baixos tanto nos vinhos monovarietais como nos vinhos multivarietais pelo que parece ser uma característica desta variedade de uva.

O teor de quercetina nos vinhos analisados variou entre 0,83 e 36,88 mg/L (Figura 3.31), nas amostras em que este componente foi detectado. A ausência deste composto não parece ser exclusiva de um determinado tipo de vinho pois observou-se em amostras de castas, anos e regiões diferentes.

A maior parte dos vinhos analisados neste trabalho apresentou teores de quercetina na gama de 10 mg/L a 20 mg/L, valores superiores à maior parte dos referidos na literatura que foram geralmente inferiores a 7 mg/L com excepção do valor máximo apresentado por I. Ginjon *et al.* que foi de 15,7 mg/L (Tabela 3.9).

Destacam-se, pelos elevados teores em quercetina (superiores a 25 mg/L), as amostras JR47, JR61, JR74 e JR80. Uma vez que não possuem características em comum, podemos inferir que tal como observado para outros compostos fenólicos, o teor final de quercetina no vinho depende fortemente do método de vinificação envolvidos.

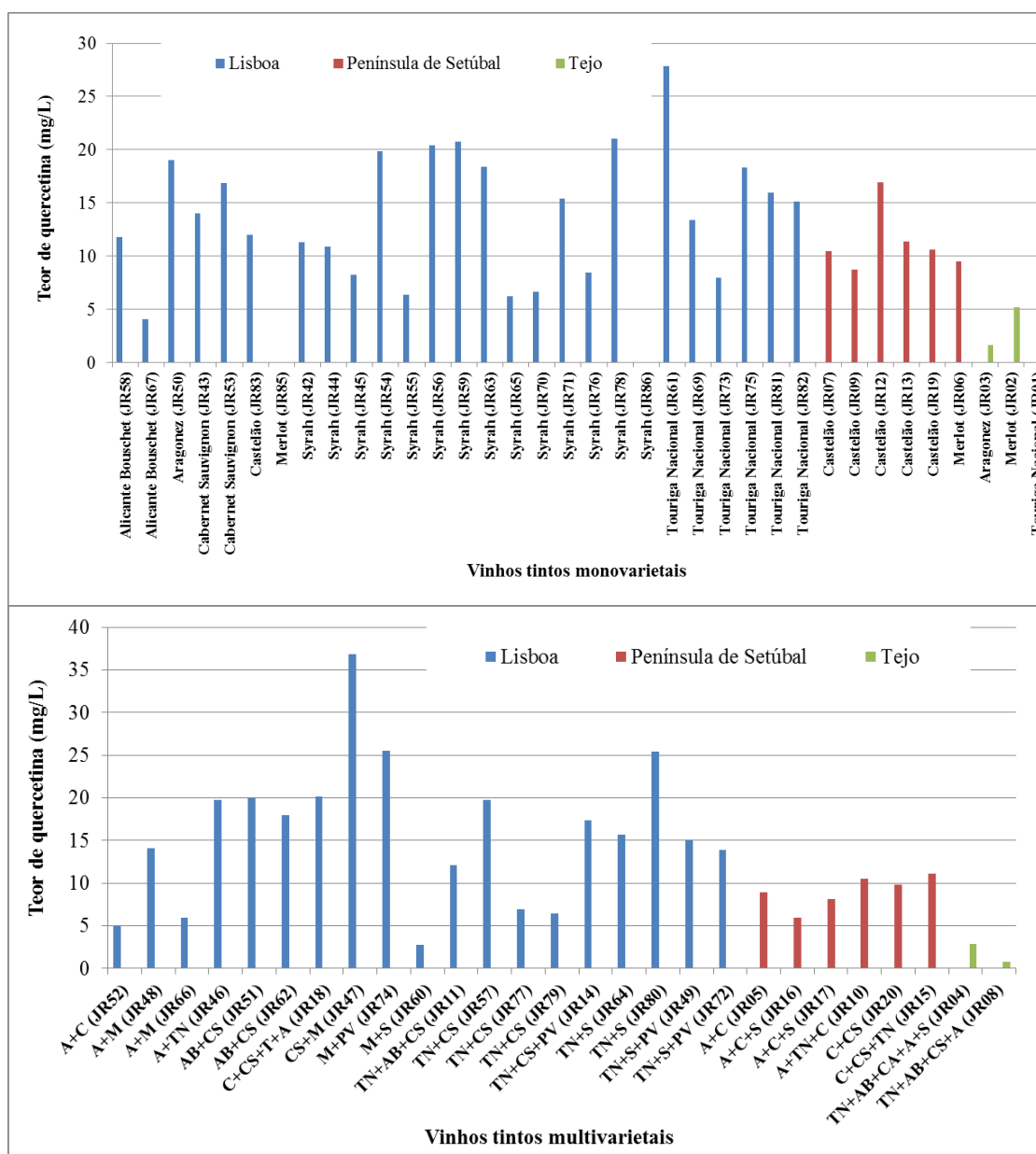


Figura 3.31 – Teor de quercetina em vinhos tintos monovarietais e multivarietais.

Os vinhos produzidos na região do Tejo apresentam teores de quercetina inferiores aos vinhos das mesmas castas produzidos nas restantes regiões, aspecto que indica a importância do solo e clima na composição final do vinho em quercetina.

Os compostos quantificados em vinhos brancos foram o ácido cafeico, o ácido ferúlico e o resveratrol. Diversos autores quantificaram o ácido gálico nos vinhos brancos, obtendo teores compreendidos entre 0,05 e 117 mg/L (Tabela 3.10). No entanto, nos vinhos brancos analisados no presente trabalho este composto não pôde ser quantificado pois, durante a separação cromatográfica co-eluiu com outros compostos com um espectro de absorção muito semelhante. Seria necessário fazer uma optimização do programa de eluição cromatográfica de modo a obter uma separação mais eficiente destes

compostos e assim obter picos distintos e bem separados para poder então quantificar o ácido gálico nos vinhos brancos. Alguns autores que fizeram a análise de compostos fenólicos nos vinhos brancos quantificaram a quercetina com teores compreendidos entre 1,4 e 10,3 mg/L. No entanto, nos vinhos analisados este composto não esteve presente, ou então ocorreu em quantidades muito inferiores ao limite de detecção.

Tabela 3.10 – Teor de compostos fenólicos individuais em vinhos brancos.

Composto	Valor mínimo (mg/L)	Valor máximo (mg/L)	Autores	Ano
Ácido gálico	1,6	13,0	M. Castellari <i>et al.</i>	2002
	1,9	84,7	D.P. Makris <i>et al.</i>	2003
	0,69	8,37	M.S. Fernández-Pachón <i>et al.</i>	2006
	ND	1,25	J. Woraratphoka <i>et al.</i>	2007
	5	117	A. Stäsko <i>et al.</i>	2008
	0,33	0,55	D. Hernanz <i>et al.</i>	2009
	0,05	9,22	S. Kallithraka <i>et al.</i>	2009
	0,47	1,22	I.V. Vrček <i>et al.</i>	2011
Ácido cafeico	0,6	7,7	M. Castellari <i>et al.</i>	2002
	44,8		D.P. Makris <i>et al.</i>	2003
	0,99	2,71	M.S. Fernández-Pachón <i>et al.</i>	2006
	ND	4,28	J. Woraratphoka <i>et al.</i>	2007
	1	8	A. Stäsko <i>et al.</i>	2008
	1,6	2,90	D. Hernanz <i>et al.</i>	2009
	0,55	1,50	S. Kallithraka <i>et al.</i>	2009
	0,27	3,44	I.V. Vrček <i>et al.</i>	2011
Ácido ferúlico	ND	0,47	M. Castellari <i>et al.</i>	2002
	0,32	0,69	S. Kallithraka <i>et al.</i>	2009
	0,06	0,23	D. Hernanz <i>et al.</i>	2009
	0,55	1,23	I.V. Vrček <i>et al.</i>	2011
trans - Resveratrol	ND	2,1	Ribeiro de Lima <i>et al.</i>	1999
	ND	0,32	M. Castellari <i>et al.</i>	2002
	ND	0,19	N. Ratola <i>et al.</i>	2004
	1,1	4,1	A. Rodríguez-Bernaldo de Quirós <i>et al.</i>	2009
	0,04	0,93	I.V. Vrček <i>et al.</i>	2011
Quercetina	ND	1,7	M. Castellari <i>et al.</i>	2002
	ND	2,12	J. Woraratphoka <i>et al.</i>	2007
	1,4	10,3	A. Rodríguez-Bernaldo de Quirós <i>et al.</i>	2009

A quantificação do ácido cafeico nos vinhos brancos monovarietais e multivarietais (Figura 3.32) revelou teores inferiores a 7 mg/L num grupo de vinhos da região de Lisboa e em todos os vinhos das regiões da Península de Setúbal e Tejo; no entanto, um conjunto de vinhos da região de Lisboa apresenta valores na gama de 10 a 20 mg/L, apesar de serem produzidos a partir de castas idênticas. Relativamente aos teores propostos pela bibliografia (Tabela 3.10), a gama encontrada no presente trabalho é muito mais alargada excepto pelo teor médio referido por D.P. Makris *et al.* (2003) que é cerca de duas vezes superior ao valor máximo encontrado no presente trabalho. As amostras que se destacam por terem uma concentração de ácido cafeico superior a 14 mg/L são as amostras JR32, JR36, JR37 e JR40. Os vinhos JR32, JR37 e JR40, apesar de serem de anos diferentes, são provenientes da mesma região e, não sendo todos monovarietais, todos foram produzidos a partir da casta Arinto.

Os vinhos brancos analisados apresentaram teores de ácido ferúlico entre 0,70 e 1,97 mg/L (Figura 3.32), gama que está ligeiramente acima mas em concordância com os teores propostos por outros autores (Tabela 3.10). Destacam-se, pela positiva, os vinhos JR21, JR40 e JR41 com teores de ácido ferúlico superiores a 1,4 mg/L, sendo que as últimas duas amostras, que possuem teores muito semelhantes, foram produzidos na mesma região e a partir da casta Arinto. Os resultados obtidos reforçam a participação da variedade da uva a partir da qual são produzidos os vinhos na sua composição fenólica, nomeadamente em ácido cafeico e ácido ferúlico.

Relativamente á quantificação do resveratrol, os vinhos brancos analisados apresentaram teores entre 0,25 mg/L e 1,85 mg/L (Figura 3.32), sendo que as amostras JR23, JR24, JR29, JR30, JR31, JR33, JR34 e JR40 apresentaram teores abaixo do limite de detecção. Estes teores são superiores aos obtidos por M. Castellari *et al.* (2002), N. Ratola *et al.* (2004) e I.V. Vrček *et al.* (2011), mas inferiores aos obtidos por A. Rodríguez-Bernaldo de Quirós *et al.* (2009). A gama proposta por Ribeiro de Lima *et al.* (1999) é mais ampla do que a gama encontrada no presente trabalho, no entanto, o valor máximo proposto pelo autor é apenas ligeiramente superior ao teor máximo dos vinhos brancos analisados.

As amostras com teores mais elevados de resveratrol (superiores a 1 mg/L), JR36 e JR39, não possuem características comuns, sem ser o facto de terem sido produzidas na mesma região. Uma vez que o resveratrol é um composto produzido na película da uva como protecção em resposta a agressões externas, é natural que os vinhos cujo mosto tenha estado mais tempo em contacto com a película, aquando da sua produção, possuam teores mais elevados de resveratrol. Desta forma, é possível inferir que ambos vinhos em questão possam ter sido submetidos a processos de vinificação semelhantes, nomeadamente a nível da duração do esmagamento das uvas e sua prensagem.

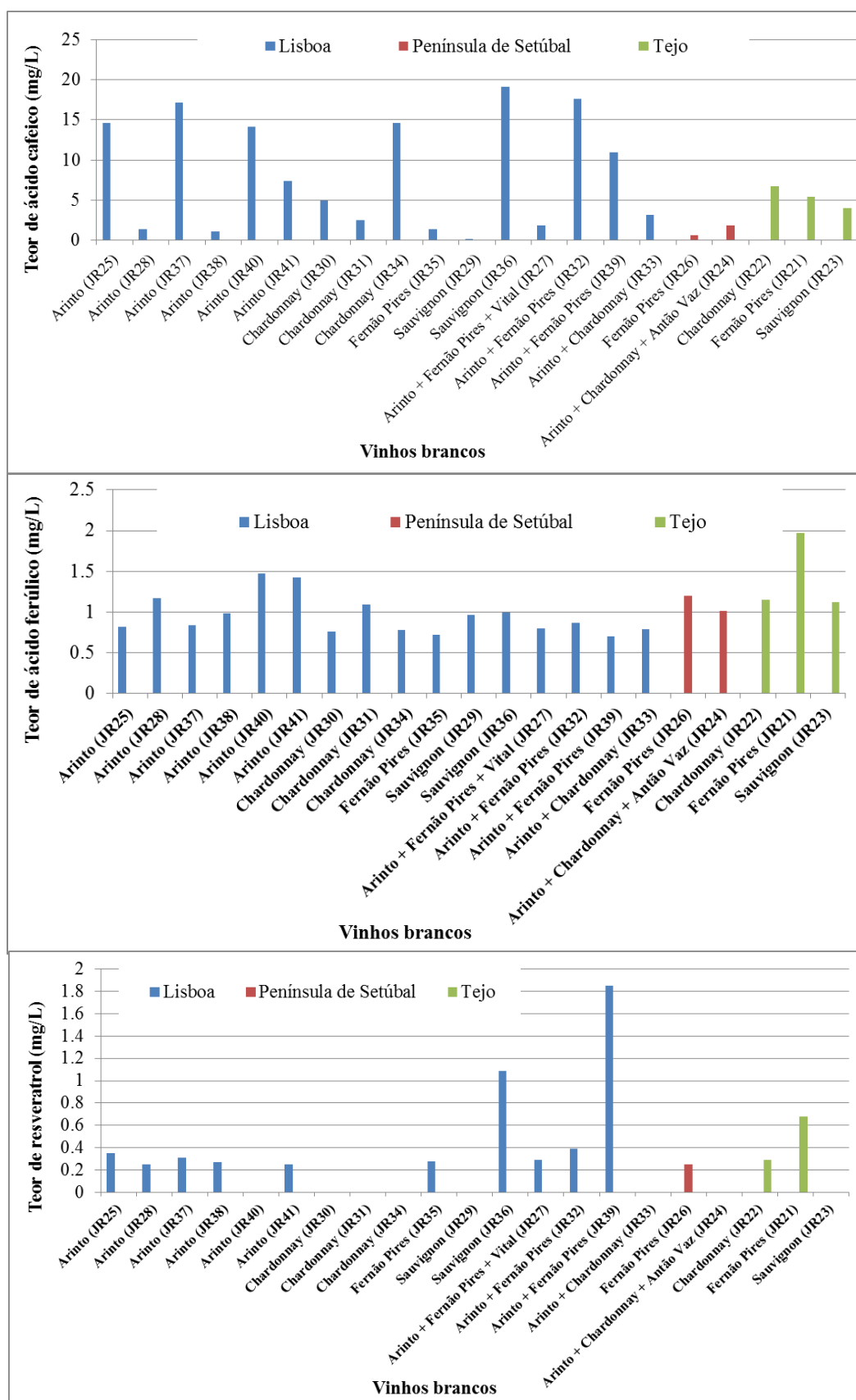


Figura 3.32 – Teor de ácido cafeico, ácido ferúlico e resveratrol em vinhos brancos monovarietais e multivarietais.

Os vinhos rosés apresentam teores de ácido gálico significativamente inferiores aos teores médios dos vinhos tintos, em concordância com os resultados de compostos fenólicos totais e de actividade antioxidante.

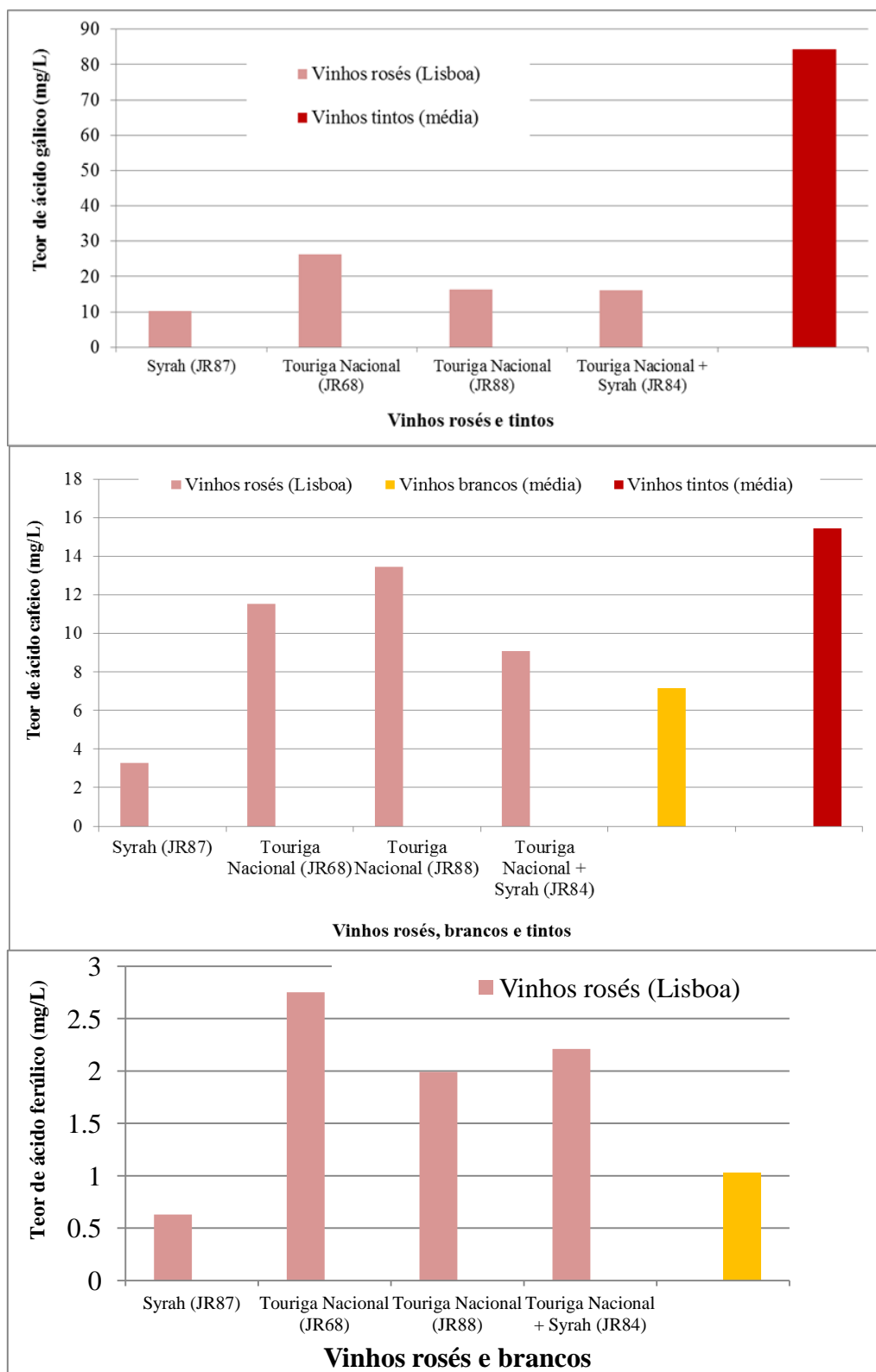


Figura 3.33 – Teor de ácido gálico e ácido cafeico em vinhos brancos e rosés.

Os vinhos rosés estudados apresentaram uma gama menos elevada de ácido gálico em comparação com os vinhos tintos, sendo os valores compreendidos entre 10,24 e 26,24 mg/L (Figura 3.33). Ao quantificar o ácido cafeico nos vinhos rosés, foram obtidos teores entre 3,29 e 11,52 mg/L (Figura 3.33), inferiores aos teores deste mesmo composto nos vinhos tintos e compreendidos na gama apresentada pelos vinhos brancos.

Tanto a nível do resveratrol como da quercetina os valores obtidos para os vinhos rosés encontravam-se abaixo do limite de detecção, excepto para a amostra JR68, onde foi determinado um teor em resveratrol de 1,92 mg/L, valor que se encontra na gama obtida para os vinhos tintos, nomeadamente das regiões da Península de Setúbal e do Tejo.

Foi no entanto identificado e quantificado o ácido ferúlico nos vinhos rosés, apresentando teores entre 0,63 e 2,75 mg/L (Figura 3.33), gama superior à obtida para os vinhos brancos estudados no presente trabalho.

Estes resultados mostram a que ponto os métodos de vinificação são importantes para o conteúdo final dos vinhos em termos de composição fenólica. De facto, os vinhos rosés possuem características em comum tanto com os vinhos tintos como com os vinhos brancos, aspectos que se reflectem depois ao identificar e quantificar os diversos compostos fenólicos.

Em primeiro lugar, denota-se que os teores em ácido ferúlico estão intrinsecamente ligados com os métodos de vinificação e não com o tipo de uva utilizado para a produção do vinho. De facto, os vinhos rosés partilham o mesmo tipo de uva (uva tinta) com os vinhos tintos e um processo de vinificação mais semelhante ao dos vinhos brancos e no entanto, o ácido ferúlico está presente apenas em vinhos brancos e rosés.

No entanto, apesar do limitado número de amostras de vinho rosé analisadas consta-se que, tal como observado nos vinhos tintos a casta Touriga Nacional apresenta teores superiores à casta Syrah o que indica que a selecção apropriada da casta é também um factor a considerar se pretendemos obter vinhos com elevado teor de fenólicos.

A importância do tipo de uva ou dos processos de vinificação aos quais são submetidos os vinhos aquando da sua produção não pode ser avaliada no que respeita a presença de resveratrol e de quercetina uma vez que estes compostos se encontram abaixo dos limites de detecção respectivos nos vinhos rosés estudados. Outro factor que contribui para esta incerteza reside no facto de não existirem estudos publicados de identificação de compostos fenólicos em vinhos rosés. Seria então necessária a realização de mais ensaios no âmbito da actividade antioxidante e composição fenólica numa amostragem mais representativa de vinhos rosés.

De uma maneira geral podemos concluir que a presença e quantidade de determinados compostos fenólicos nos vinhos está relacionada, não só mas também, com o tipo e variedade de uva seleccionada e/ou com os métodos de vinificação aplicados aquando da produção do vinho.

3.3 – Cor

3.3.1 – Tonalidade, Intensidade e Brilho

O parâmetro tonalidade nos vinhos tintos é indicativo do desenvolvimento da cor para tons laranja, sendo calculado através da razão entre as absorvâncias medidas aos comprimentos de onda de 420 e 520 nm; este parâmetro é indicativo da idade do vinho pois ao longo do tempo, as antocianinas responsáveis pela cor vermelha reagem com outros compostos, diminuindo a quantidade de antocianinas livres (S. Pérez-Margariño & M.L. González-San José, 2006), fazendo com que ocorra um desvio da absorvância do vinho do comprimento de onda característico do vermelho para o característico do amarelo. De maneira geral, vinhos apresentando uma tonalidade igual ou inferior a 0,6 são considerados vinhos novos com um tempo de maturação relativamente curto (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006b).

O brilho é um parâmetro que indica a dominância da coloração vermelha, ou seja, quanto mais elevada for a absorvância ao comprimento de onda correspondente ao vermelho, mais elevado será o brilho. Desta forma, quanto mais elevada for a tonalidade e menor for o brilho, maior é o desvio para o amarelo e maior foi o tempo de maturação do vinho. Na presente amostragem (Tabelas 3.11 e 3.12) os vinhos considerados novos são as amostras JR01, JR02, JR03, JR04, JR16, JR17 e JR45, resultados que eram de esperar uma vez que todos estes vinhos partilham o mesmo ano de produção mais recente, 2010, e portanto tiveram um período de maturação menos prolongado. Os vinhos JR51 e JR62 apresentam valores de tonalidade muito superiores às restantes amostras, mesmo aquelas produzidas no mesmo ano, com as mesmas castas. Uma possível explicação para este facto poderá ser uma alteração em parâmetros de vinificação destes dois vinhos em particular, como por exemplo, um tempo de maturação em barricas de carvalho mais prolongado antes do engarrafamento. De facto, uma maturação mais longa na presença de madeira permite uma maior passagem de compostos fenólicos para o vinho mas também maior ocorrência de colóides formados por antocianinas, diminuindo a quantidade de antocianinas livres e a absorvância no comprimento de onda correspondente ao vermelho.

Diversos estudos realizados (S. Tsanova-Savova *et al.*, 2002; Pérez-Margariño & M.L. González-San José, 2006; C. Pérez-Lamela *et al.*, 2007; F. Chinnici *et al.*, 2009; M.-A. Ducasse *et al.*, 2010) utilizam a tonalidade como um dos vários parâmetros de avaliação da evolução de um vinho sujeito a determinados processos, a nível da vinificação e maturação, ao longo do tempo. Muitos destes estudos incidem particularmente na reacção de vinhos produzidos a partir de determinadas castas e anos de produção aos diferentes processos de vinificação e maturação.

A intensidade da cor dos vinhos permite a monitorização dos compostos com absorvâncias nos comprimentos de onda correspondentes ao amarelo, vermelho e azul. Desta forma, quanto mais elevada for a intensidade de um vinho, maior a quantidade de compostos que absorvem a estes

comprimentos de onda, nomeadamente alguns compostos fenólicos. De maneira idêntica à utilização da tonalidade, a intensidade é muitas vezes um parâmetro de monitorização da evolução de um vinho (S. Tsanova-Savova *et al.*, 2002; Pérez-Margariño & M.L. González-San José, 2006; C. Pérez-Lamela *et al.*, 2007; M.-I. Salaha *et al.*, 2008; V.M. Burin *et al.*, 2010; S. Caillé *et al.*, 2010; M.L. Escudero-Gilete *et al.*, 2010; González-del-Pozo *et al.*, 2010; K. Chira *et al.*, 2011). De facto, se um vinho for submetido a diversos tratamentos durante a sua produção ou até armazenagem, é natural existirem modificações na sua composição, aspecto que se pode traduzir numa alteração a nível da intensidade da cor.

Os vinhos que se destacam com uma intensidade de cor elevada (superior a 1,7) são as amostras JR14 e JR53 (Tabelas 3.11 e 3.12). Estas amostras destacam-se igualmente nos ensaios de determinação de actividade antioxidante realizados no presente trabalho, assim como a nível dos diversos compostos fenólicos quantificados, nomeadamente do ácido gálico e da quercetina.

Tabela 3.11 – Tonalidade, Intensidade e Brilho de vinhos tintos monovarietais

Região	Amostra	Tonalidade	Intensidade	Brilho (%)
Lisboa	Alicante Bouschet (JR43)	0,7	1,7	52,8
	Alicante Bouschet (JR53)	0,9	1,8	44,4
	Aragonez (JR58)	1	0,9	37,5
	Aragonez (JR67)	0,9	1,2	42,6
	Cabernet Sauvignon (JR50)	0,7	1,5	49,6
	Castelão (JR83)	0,8	1	49,6
	Merlot (JR85)	0,9	0,9	45,8
	Syrah (JR42)	0,7	1,1	51,6
	Syrah (JR44)	0,8	1,1	47
	Syrah (JR45)	0,6	1	62,5
	Syrah (JR54)	0,7	1	55,3
	Syrah (JR55)	0,7	0,8	53,9
	Syrah (JR56)	0,7	1	55,2
	Syrah (JR59)	0,9	1	45
	Syrah (JR63)	0,8	1,3	47,8
	Syrah (JR65)	0,8	1,4	50,4
	Syrah (JR70)	0,8	1,1	51,3
	Syrah (JR71)	0,8	0,8	50,4
	Syrah (JR76)	0,8	0,9	50,2
	Syrah (JR78)	0,9	0,9	46,2
	Syrah (JR86)	0,9	0,9	46,6
	Touriga Nacional (JR61)	0,8	1,6	48,7
	Touriga Nacional (JR69)	0,9	0,9	48
	Touriga Nacional (JR73)	0,9	1	45,5
	Touriga Nacional (JR75)	0,8	1,2	48,7
	Touriga Nacional (JR81)	0,8	1,2	48,2
	Touriga Nacional (JR82)	0,7	1,5	51,2
Península de Setúbal	Castelão (JR07)	0,8	1,1	50,4
	Castelão (JR09)	0,7	0,5	53
	Castelão (JR12)	0,9	0,8	44,5
	Castelão (JR13)	0,9	0,9	43,6
	Castelão (JR19)	0,8	0,8	47,2
	Merlot (JR06)	0,7	1	52,2
Tejo	Cabernet Sauvignon (JR03)	0,6	1,1	58,3
	Merlot (JR02)	0,6	0,7	61,8
	Touriga Nacional (JR01)	0,6	1	55,1

NQ: Não quantificável

Tabela 3.12 – Tonalidade, Intensidade e Brilho de vinhos tintos multivarietais

Região	Amostra	Tonalidade	Intensidade	Brilho (%)
Lisboa	A+C (JR52)	0,8	1,1	48,4
	A+M (JR48)	0,7	1,2	50,9
	A+M (JR66)	0,8	1	49,6
	A+TN (JR46)	0,8	0,9	46,9
	AB+CS (JR51)	3,5	1,5	NQ
	AB+CS (JR62)	3,4	1,5	NQ
	C+CS+T+A (JR18)	0,8	1,2	47,4
	CS+M (JR47)	0,7	1,3	53
	M+PV (JR74)	0,7	1,6	54,9
	M+S (JR60)	0,9	0,7	45,8
	TN+AB+CS (JR11)	0,9	1,4	41
	TN+CS (JR57)	0,7	1,5	50,8
	TN+CS (JR77)	0,7	1,4	53
	TN+CS (JR79)	0,7	1,4	52,8
	TN+CS+PV (JR14)	0,9	2,1	40,5
	TN+S (JR64)	0,8	1,4	46,7
	TN+S (JR80)	0,7	1,5	53,2
	TN+S+PV (JR49)	0,8	1,3	46,3
	TN+S+PV (JR72)	0,8	1,3	46
Península de Setúbal	A+C (JR05)	0,8	0,9	41,8
	A+C+S (JR16)	0,6	0,8	57,2
	A+C+S (JR17)	0,6	0,8	58,1
	A+TN+C (JR10)	0,8	1	46,8
	C+CS (JR20)	0,7	1,5	51,3
	C+CS+TN (JR15)	0,8	1	48,8
Tejo	TN+AB+CS+A+S (JR04)	0,6	0,9	54,2
	TN+AB+CS+A (JR08)	0,8	1,1	48,6

NQ: Não quantificável

3.3.2 – Composição de cor

A composição da cor normal para os vinhos tintos corresponde a percentagens de amarelo, vermelho e azul de 35, 55 e 10%, respectivamente (Glories, 1984). Da presente amostragem, os vinhos cuja composição de cor que mais se aproxima destas proporções são as amostras JR16 e JR17 (Tabelas 3.13 e 3.14). Ambos vinhos são originários da região Península de Setúbal, produzidos em 2010 a partir das castas Aragonez, Castelão e Syrah. Uma vez que estes vinhos não se destacam em nenhum dos ensaios de determinação da actividade antioxidante nem na quantificação de compostos fenólicos, é possível inferir que uma composição de cor considerada próxima do ideal não reflecte o poder antioxidante do vinho em questão.

As amostras JR51 e JR62, (Figura 3.34) ambas correspondentes a vinhos com as castas Cabernet Sauvignon e Alicante Bouschet, e produzidos na região de Lisboa apresentam percentagens de amarelo e percentagens de azul excepcionalmente altas e consequentemente uma percentagem de vermelho bastante inferior a todos os outros vinhos tintos. Estes dois vinhos apresentam também um poder redutor superior à maior parte dos restantes vinhos tintos, bem como valores elevados de actividade antiradicalar relativa ao DPPH e teor de fenólicos totais na reacção de Folin-Ciocalteu. Já as amostras JR05 da Península de Setúbal e JR04 da região Tejo, que apresentam também uma elevada percentagem de azul mas menor percentagem de amarelo, não apresentam valores tão elevados das propriedades antioxidantes o que pode sugerir um papel relevante dos componentes que contribuem para a cor amarela na actividade antioxidante de vinhos tintos.

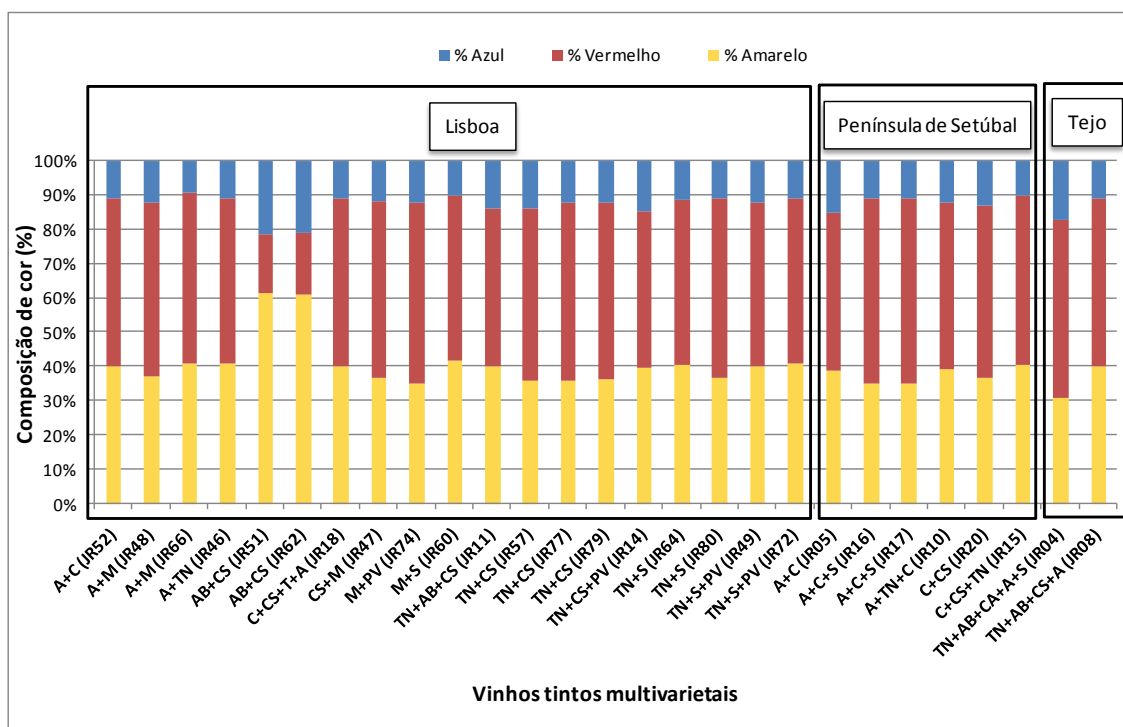


Figura 3.34 – Composição de cor de vinhos tintos multivarietais

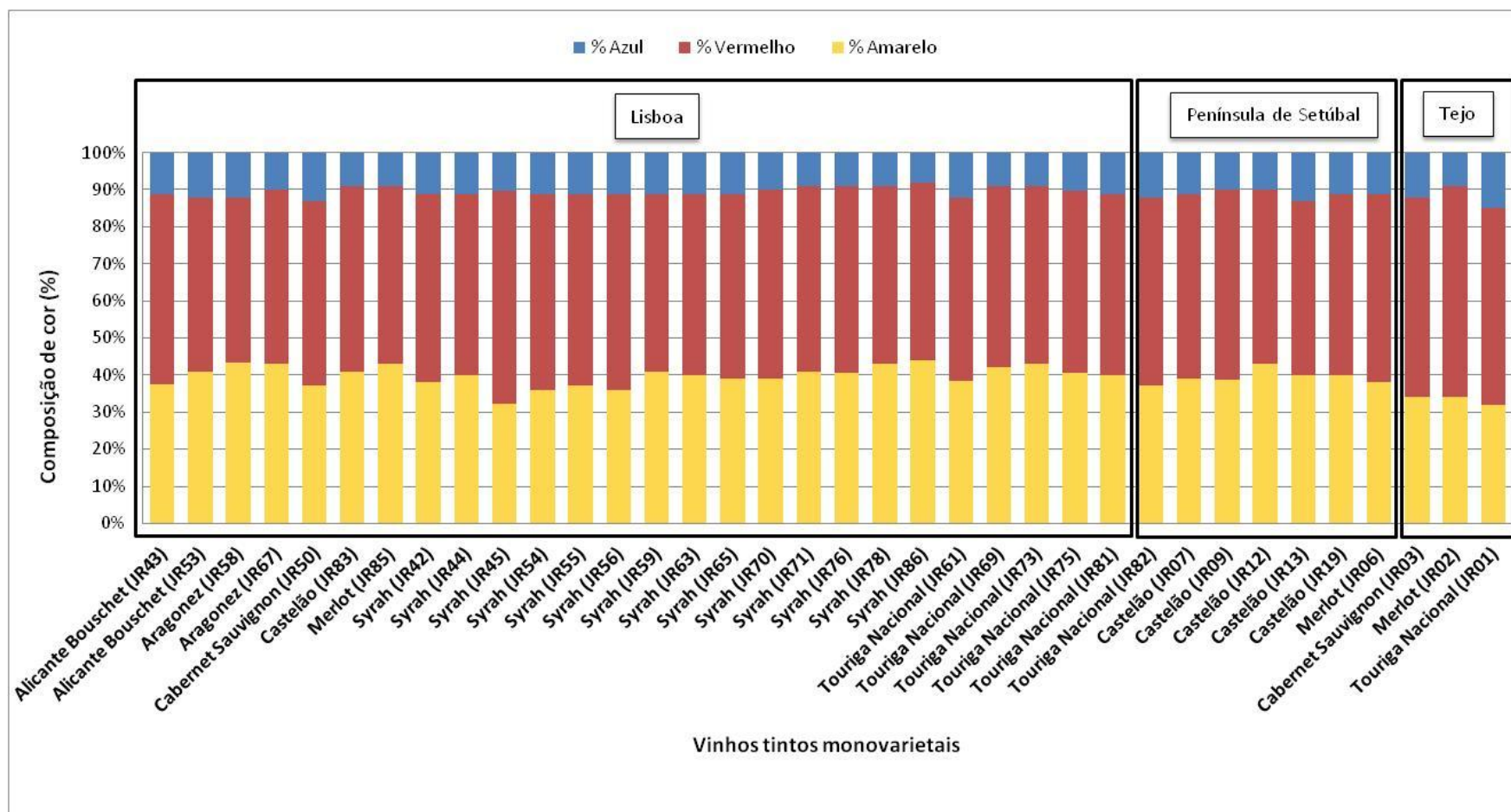


Figura 3.35 – Composição de cor de vinhos tintos monovarietais

Tabela 3.13 – Composição de cor de vinhos tintos monovarietais

Região	Amostra	% Amarelo	% Vermelho	% Azul
Lisboa	Alicante Bouschet (JR43)	37	51	11
	Alicante Bouschet (JR53)	41	47	12
	Aragonez (JR58)	43	44	12
	Aragonez (JR67)	43	47	10
	Cabernet Sauvignon (JR50)	37	50	13
	Castelão (JR83)	41	50	9
	Merlot (JR85)	43	48	9
	Syrah (JR42)	38	51	11
	Syrah (JR44)	40	49	11
	Syrah (JR45)	32	57	10
	Syrah (JR54)	36	53	11
	Syrah (JR55)	37	52	11
	Syrah (JR56)	36	53	11
	Syrah (JR59)	41	48	11
	Syrah (JR63)	40	49	11
	Syrah (JR65)	39	50	11
	Syrah (JR70)	39	51	10
	Syrah (JR71)	41	50	9
	Syrah (JR76)	40	50	9
	Syrah (JR78)	43	48	9
	Syrah (JR86)	44	48	8
	Touriga Nacional (JR61)	38	49	12
	Touriga Nacional (JR69)	42	49	9
	Touriga Nacional (JR73)	43	48	9
	Touriga Nacional (JR75)	40	49	10
	Touriga Nacional (JR81)	40	49	11
	Touriga Nacional (JR82)	37	51	12
Península de Setúbal	Castelão (JR07)	39	50	11
	Castelão (JR09)	39	52	10
	Castelão (JR12)	43	47	10
	Castelão (JR13)	40	47	13
	Castelão (JR19)	40	49	11
	Merlot (JR06)	38	51	11
Tejo	Cabernet Sauvignon (JR03)	34	54	12
	Merlot (JR02)	34	57	9
	Touriga Nacional (JR01)	32	53	15

Tabela 3.14 – Composição de cor de vinhos tintos multivarietais

Região	Amostra	% Amarelo	% Vermelho	% Azul
Lisboa	A+C (JR52)	40	49	11
	A+M (JR48)	37	50	12
	A+M (JR66)	41	50	9
	A+TN (JR46)	41	48	11
	AB+CS (JR51)	61	17	21
	AB+CS (JR62)	61	18	21
	C+CS+T+A (JR18)	40	49	11
	CS+M (JR47)	37	52	12
	M+PV (JR74)	35	53	12
	M+S (JR60)	42	48	10
	TN+AB+CS (JR11)	40	46	14
	TN+CS (JR57)	36	50	14
	TN+CS (JR77)	36	52	12
	TN+CS (JR79)	36	51	12
	TN+CS+PV (JR14)	40	46	15
	TN+S (JR64)	40	48	11
	TN+S (JR80)	37	52	11
	TN+S+PV (JR49)	40	48	12
	TN+S+PV (JR72)	41	48	11
Península de Setúbal	A+C (JR05)	39	46	15
	A+C+S (JR16)	35	54	11
	A+C+S (JR17)	35	54	11
	A+TN+C (JR10)	39	48	12
	C+CS (JR20)	37	51	13
	C+CS+TN (JR15)	40	49	10
Tejo	TN+AB+CS+A+S (JR04)	31	52	17
	TN+AB+CS+A (JR08)	40	49	11

Os vinhos tintos monovarietais da região Tejo (Figura 3.34) apresentam contribuições de percentagem de vermelho e percentagem de azul particularmente elevadas por comparação com a média das outras regiões mas dado o reduzido número de amostras não podemos concluir tratar-se de uma característica específica dos vinhos desta região.

Estudos realizados por Tsanova-Savova *et al.* (2002) apresentam vinhos produzidos a partir da casta Cabernet Sauvignon como tendo uma composição de cor mais próxima das proporções ideais. S. Pérez-Margariño & M.L. González-San José (2006) estudaram igualmente vinhos produzidos a partir da casta Cabernet Sauvignon, apresentando percentagens de amarelo, vermelho e azul de 33%, 57% e 10%, respectivamente. A composição de cor destes vinhos difere não só da ideal mas também da

proposta por Tsanova-Savova *et al.* (2002), assim como dos vinhos com as mesmas características na presente amostragem. A. González-del Pozo *et al.* (2010) estudaram a composição da cor de vinhos produzidos a partir da casta Cabernet Sauvignon e a sua variação à medida que o vinho foi submetido a diversos processos de micro-oxigenação. Ao considerar o grupo de vinhos controlo, que não foram submetidos a qualquer tipo de alteração e portanto análogos aos vinhos estudados no presente trabalho, os autores obtiveram percentagens de amarelo, vermelho e azul de 30%, 59% e 11%, respectivamente. Mais uma vez, a composição da cor afasta-se da ideal, apesar do vinho estudado possuir as mesmas características a nível de castas que os vinhos tidos em conta nos estudos previamente referidos.

Nas amostras estudadas, os vinhos JR03 e JR50, ambos vinhos monovarietais produzidos a partir da casta Cabernet Sauvignon, não apresentam a proporção de cor ideal, apesar da composição da amostra JR03 não se afastar muito da pretendida.

O facto de existirem vários trabalhos realizados com o mesmo tipo de vinho e de se terem obtido resultados tão variáveis confirma a noção de que tal como a actividade antioxidante também a composição da cor depende de múltiplos factores e não apenas da casta ou castas utilizadas na produção do vinho.

3.4 – Correlações lineares entre os diversos parâmetros estudados

Para avaliar a correlação entre as propriedades antioxidantes das amostras estudadas, as suas características cromáticas e o seu teor de compostos fenólicos determinaram-se as funções lineares existentes entre os vários parâmetros estudados neste trabalho e calcularam-se os correspondentes coeficientes de correlação de Pearson; quando este coeficiente se situa entre 0,5 e 0,8 considera-se que os parâmetros envolvidos estão moderadamente correlacionados através de uma função linear; quando o coeficiente de correlação de Pearson é superior a 0,8 considera-se existir uma correlação linear forte entre os parâmetros em causa.

3.4.1 – Correlações entre as várias medidas de actividade antioxidante

A actividade antioxidante de cada vinho é uma propriedade que resulta da presença de diversas espécies antioxidantes que podem apresentar diferentes características estruturais e diferentes mecanismos de acção. Pretendeu-se comparar a actividade antiradicalar, a actividade redutora e o teor de compostos fenólicos totais de vinhos tintos e brancos da região de Lisboa e testar a existência de relações lineares entre estas propriedades. Assim, determinaram-se os coeficientes de correlação de Pearson correspondentes a estes parâmetros avaliados em vinhos da região de Lisboa (Tabela 3.15).

Foram considerados em conjunto os vinhos monovarietais e multivarietais de cada tipo (branco ou tinto) pois a análise anteriormente efectuada não revelou um comportamento distinto entre vinhos de uma única casta ou de várias castas. Já no que diz respeito à origem geográfica considerou-se apenas a região de Lisboa pois as regiões da Península de Setúbal e Tejo não estavam tão representadas na amostragem e os vinhos destas regiões apresentaram um comportamento muito distinto dos vinhos da região de Lisboa, sobretudo no caso dos vinhos brancos.

Tabela 3.15 – Coeficientes de correlação de Pearson das relações lineares entre os parâmetros descritivos da actividade antioxidante de vinhos brancos e tintos da região de Lisboa.

	DPPH		FRAP		Folin-Ciocalteu		Anião Superóxido	
	Tintos	Brancos	Tintos	Brancos	Tintos	Brancos	Tintos	Brancos
DPPH	1	1	0,712	0,742	0,814	0,629	-	0,673
FRAP			1	1	0,827	0,725	-	0,814
Folin-Ciocalteu					1	1	-	0,768

O teor de compostos fenólicos dos vinhos tintos apresenta uma correlação positiva forte com o poder redutor destes vinhos bem como com a sua actividade de sequestração do radical DPPH.

O teor de compostos fenólicos dos vinhos brancos também apresenta uma correlação positiva com as suas propriedades antioxidantes, mas com coeficientes de correlação inferiores aos dos vinhos tintos.

Tanto no caso dos vinhos tintos como dos brancos encontrou-se uma associação mais forte entre o teor de compostos fenólicos e o poder redutor do que entre o teor de compostos fenólicos e a actividade antiradicalar relativamente ao DPPH, ou seja, os compostos de estrutura fenólica estão associados às propriedades antioxidantes do vinho mas parecem estar mais fortemente correlacionados com o seu poder redutor dos vinhos do que com as suas propriedades antiradicalares.

O poder redutor e a actividade antiradicalar relativa ao DPPH apresentaram uma correlação positiva moderada tanto para vinhos brancos como para vinhos tintos o que indica que os antioxidantes presentes nos vinhos analisados parecem ter simultaneamente actividade antiradicalar e actividade redutora.

No caso dos vinhos brancos foi ainda determinada a actividade antiradicalar relativa ao radical anião superóxido, um radical instável de oxigénio, com relevância biológica. Observou-se uma correlação positiva forte desta actividade com a actividade redutora e uma correlação moderada com o teor de compostos fenólicos e com a actividade antiradicalar relativamente ao DPPH.

Estes resultados indicam que os componentes do vinho com maior capacidade de sequestração do anião radical superóxido são aqueles que apresentam maior capacidade de redução férrica, ou seja, maior capacidade de transferir electrões para espécies oxidadas.

3.4.2 – Correlações entre a actividade antioxidante e a absorvância na região do visível

A actividade antioxidante pode estar relacionada com as propriedades cromáticas dos vinhos na medida em que as espécies químicas que lhe conferem cor contribuem também para a sua actividade antioxidante. Para avaliar a correlação entre propriedades cromáticas e propriedades antioxidantes calcularam-se os coeficientes de correlação de Pearson correspondentes às relações lineares entre a actividade antioxidante dos vinhos da região de Lisboa e a sua absorvância na região do visível (Tabela 3.16). Observou-se uma correlação positiva moderada entre a actividade antioxidante (antiradicalar e redutora) e as absorvâncias aos comprimentos de onda correspondentes ao amarelo (420 nm) e ao azul (620 nm).

Tabela 3.16 – Coeficientes de correlação de Pearson das relações lineares entre parâmetros descritivos da actividade antioxidante de vinhos da região de Lisboa e a respectiva absorvância avaliada aos comprimentos de onda de 420 nm, 520 nm e 620 nm.

Absorvância	DPPH		FRAP		Folin-Ciocalteu		Anião Superóxido	
	Tintos	Branco	Tintos	Branco	Tintos	Branco	Tintos	Branco
A(420 nm)	0,650	0,352	0,753	0,249	0,787	0,202	-	0,595
A(520 nm)	0,279	0,145	0,215	0,045	0,260	0,089	-	0,089
A(620 nm)	0,673	0,354	0,692	0,465	0,758	0,4	-	0,519

Não se observou uma correlação linear entre a absorvância ao comprimento de onda associado à cor vermelha (520 nm) e qualquer das medidas de actividade antioxidante realizadas, nem entre esta absorvância e o teor de compostos fenólicos totais. Este resultado parece indicar que algumas espécies que contribuem para a cor vermelha dos vinhos tintos não apresentam uma estrutura fenólica nem contribuem significativamente para as propriedades antioxidantes desses vinhos.

Por outro lado, o valor dos coeficientes de correlação parecem indicar que os compostos com actividade redutora contribuem mais para a componente amarela da cor do vinho enquanto os componentes com maior actividade antiradicalar relativa ao DPPH contribuem mais para a componente azul da cor do vinho. A actividade antiradicalar relativa ao anião superóxido apresentou uma correlação positiva moderada tanto com a absorvância a 420 nm como com a absorvância a 620 nm. Este resultado é coerente com o que se conhece sobre os mecanismos de acção dos antioxidantes: as espécies com actividade antiradicalar são geralmente espécies capazes de doar átomos de hidrogénio enquanto as espécies com elevado poder redutor são espécies com grande facilidade em doar electrões, nomeadamente através de estabilização da carga positiva resultante e rearranjo intramolecular. Os compostos fenólicos são geralmente capazes de actuar de acordo com estes dois mecanismos, no entanto alguns compostos individuais apresentam uma maior facilidade em reagir por uma destas vias específicas.

No caso dos testes incluídos neste trabalho verifica-se uma diferença sistemática entre a reactividade das amostras no teste do DPPH que é especialmente reactivo com espécies doadoras de átomos de hidrogénio e os testes de poder redutor (FRAP) e reacção de Folin-Ciocalteu cujos reagentes requerem espécies doadoras de electrões para dar origem aos derivados corados.

Os vinhos brancos não apresentaram correlações lineares entre as absorvâncias medidas aos vários comprimentos de onda e os testes DPPH, poder redutor (FRAP) e reacção de Folin-Ciocalteu, mas obtiveram-se coeficientes de correlação de Pearson mais elevados para os comprimentos de onda de 420 nm e de 620 nm.

No caso do poder redutor e da reacção de Folin-Ciocalteu observa-se uma maior correlação com a absorvância a 620 nm, enquanto a actividade antiradicalar relativa ao DPPH parece ter uma correlação idêntica com a absorvância a 420 nm e a 620 nm.

A actividade antiradicalar dos vinhos brancos relativamente ao anião superóxido apresentou uma correlação positiva moderada com as absorvâncias a 420 nm e a 620 nm.

A correlação dos parâmetros tonalidade, intensidade, brilho e composição da cor foi também testada através da determinação de coeficientes de correlação de Pearson (Tabela 3.17).

Uma vez que se tinha verificado não existir uma correlação linear entre a absorvância a 520 nm e a actividade antioxidante do vinho ou o seu teor em compostos fenólicos não é de estranhar que os parâmetros mais influenciados por esta absorvância (a tonalidade e o brilho e a percentagem de vermelho), apresentem coeficientes de correlação de Pearson baixos ou correlações inversamente proporcionais com as propriedades antioxidantes.

Os vinhos tintos apresentaram correlações positivas moderadas entre todos os testes de actividade antioxidante e a intensidade da cor bem como com a percentagem de azul, o que evidencia a importância de espécies fenólicas que contribuem para a cor azul, como é o caso de diversas antocianinas, para a actividade antioxidante de vinhos tintos.

Tabela 3.17 – Coeficientes de correlação de Pearson das relações lineares entre parâmetros descritivos da actividade antioxidante de vinhos da região de Lisboa e os parâmetros tonalidade, intensidade, brilho (vinhos tintos) e composição da cor (vinhos tintos e brancos).

		DPPH		FRAP		Folin-Ciocalteu		Anião Superóxido
		Tinto	Branco	Tinto	Branco	Tinto	Branco	Branco
Tonalidade		0,153	-	0,240	-	0,145	-	
Intensidade		0,586	-	0,608	-	0,665	-	
Brilho		0,324*	-	0,374*	-	0,318*	-	
Composição	% Amarelo	0,261	0,224	0,459	0,000	0,410	0,063	0,302
	% Vermelho	0,399*	0,272	0,536*	0,084	0,534*	0,032	0,288
	% Azul	0,584	0,164	0,559	0,055	0,641	0,084	0,310

*Variáveis inversamente proporcionais

Os dois testes que envolvem transferência electrónica (FRAP e Folin-Ciocalteu) apresentaram uma correlação inversa moderada com a percentagem de vermelho, ou seja, o poder redutor dos vinhos tintos analisados é tanto maior quanto maiores forem as componentes amarela e azul da sua cor.

Os vinhos brancos não apresentam correlações lineares entre a actividade antioxidante e a composição da cor ainda que se obtenham maiores coeficientes de correlação nos testes de actividade antiradicalar (DPPH e anião superóxido) do que nos testes de actividade redutora (FRAP e Folin-Ciocalteu).

3.4.3 – Correlações entre a actividade antioxidante e o perfil de compostos fenólicos obtido por HPLC

3.4.3.1 – Somatórios das áreas cromatográficas a comprimentos de onda específicos

As propriedades antioxidantes dos vinhos da região de Lisboa foram ainda representadas em função dos correspondentes somatórios das áreas dos cromatogramas de HPLC obtidos com detecção selectiva aos comprimentos de onda máximos de absorção de diversos compostos fenólicos. Os comprimentos de onda seleccionados correspondem como foi indicado aos máximos de absorvância de derivados do ácido benzóico ($\lambda = 280$ nm), derivados do ácido hidroxicinâmico ($\lambda = 320$ nm) e flavonóis ($\lambda = 360$ nm). Os coeficientes de correlação de Pearson de cada uma destas relações permitem avaliar se existe uma relação linear entre as concentrações de cada um destes grupos de compostos e as propriedades antioxidantes avaliadas nestas amostras.

Esta comparação permite ter em conta o contributo dos vários compostos fenólicos detectados em HPLC ainda que a sua identidade não tenha sido estudada com recurso a padrões cromatográficos. A detecção a comprimentos de onda específicos permite analisar o contributo de conjuntos de compostos fenólicos que partilham estruturas idênticas e a área cromatográfica é proporcional à sua concentração no vinho.

A necessidade de efectuar esta análise surgiu da constatação de terem sido detectados nas amostras de vinhos tintos e brancos, diversos compostos com áreas cromatográficas bastante superiores às dos compostos estudados com recurso a padrões e que portanto poderiam ter um maior impacto nas propriedades antioxidantes e teor de fenólicos totais dessas mesmas amostras.

Tabela 3.18 – Coeficientes de correlação de Pearson das relações lineares entre parâmetros descritivos da actividade antioxidante de vinhos da região de Lisboa e as áreas totais dos cromatogramas obtidos em HPLC com detecção selectiva aos comprimentos de onda de 280 nm, 320 nm e 360 nm.

	DPPH		FRAP		Folin-Ciocalteu		Anião Superóxido
	Tintos	Branco	Tintos	Branco	Tintos	Branco	Branco
Σarea(280 nm)	0,575	0,425	0,690	0,753	0,773	0,843	0,863
Σarea (320 nm)	0,324	0,560	0,528	0,887	0,577	0,729	0,928
Σarea (360 nm)	0,354	0,607	0,526	0,733	0,494	0,629	0,795

Efectivamente obtiveram-se melhores correlações da actividade antioxidante dos vinhos com os somatórios das áreas cromatográficas a comprimentos de onda específicos do que com qualquer outro parâmetro considerado (Tabela 3.18).

Em particular obtiveram-se correlações lineares fortes entre a actividade redutora bem como a actividade de sequestração do radical superóxido e o somatório das áreas cromatográficas detectadas ao comprimento de onda de 280 nm, para vinhos brancos. Este somatório que reflecte a concentração de compostos análogos a ácidos fenólicos simples apresenta também correlações moderadas com a actividade redutora de vinhos tintos e brancos bem como com a actividade antiradicalar relativa ao DPPH de vinhos tintos.

O somatório da área cromatográfica detectada ao comprimento de onda de 320 nm reflecte especificamente a concentração de ácidos hidroxycinâmicos como o ácido cafeico ou ferúlico e apresentou correlações moderadas (DPPH e Folin-Ciocalteu) ou fortes (FRAP e anião superóxido) com a actividade antioxidante de vinhos brancos o que é uma evidência da importância destes compostos fenólicos nas propriedades funcionais deste tipo de vinhos.

Este somatório apresentou também correlações moderadas com o poder redutor e teor de fenólicos totais de vinhos tintos o que indica existir também uma contribuição significativa dos ácidos hidroxycinâmicos para a actividade redutora destes vinhos.

Finalmente o somatório das áreas dos picos cromatográficos detectados a 360 nm é proporcional à concentração de flavonóis como a quercetina e apresentou correlações moderadas com todas as determinações de actividade antioxidante dos vinhos brancos bem como com o poder redutor de vinhos tintos.

3.4.3.2 – Concentrações de compostos fenólicos específicos

Alguns dos compostos fenólicos presentes no perfil de HPLC de vinhos tintos e brancos foram identificados como foi referido, utilizando padrões cromatográficos e foram quantificados mediante o traçado de rectas de calibração. Procurou-se então avaliar se algum destes compostos quantificados nas amostras apresenta uma correlação positiva significativa com a actividade antioxidante dessas amostras (Tabela 3.19).

Tabela 3.19 – Coeficientes de correlação de Pearson entre parâmetros descritivos da actividade antioxidante de vinhos da região de Lisboa e as concentrações de alguns componentes fenólicos individuais.

Concentração (mg/L)	DPPH		FRAP		Folin-Ciocalteu		Anião Superóxido
	Tintos	Branco	Tintos	Branco	Tintos	Branco	Branco
Ácido gálico	0,607	NQ	0,589	NQ	0,729	NQ	NQ
Ácido cafeico	0,217	0,036	0,080	0,209	0,050	0,007	<u>0,863</u>
Ácido ferúlico	-	0,272	-	0,308	-	0,346	0,311
Quercetina	0,346	-	0,352	-	0,325	-	-
Resveratrol	0,085	0,286	0,049	0,281	0,032	0,305	0,202

NQ = não quantificado por co-eluição com componente não identificado

O teor de ácido gálico de vinhos tintos apresenta uma correlação positiva moderada com as actividades antirradicalar e redutora bem como com o teor de compostos fenólicos totais. A correlação é ligeiramente melhor com a actividade de sequestração do DPPH, o que evidencia a boa capacidade de cedência de um átomo de hidrogénio pelo ácido gálico e isómeros através da estabilização do radical resultante por pontes de hidrogénio e rearranjo intramolecular.

Também se observou uma correlação positiva forte entre o teor de ácido cafeico em vinhos brancos e a sua actividade de sequestração do anião superóxido o que é um indicativo da relevância deste composto para a actividade biológica dos vinhos brancos.

Os restantes componentes não apresentam correlações lineares significativas com as propriedades antioxidantes dos vinhos provavelmente devido à baixa concentração destes componentes individuais, e à possibilidade da sua concentração ser afectada por parâmetros do processo de vinificação que podem diferir dentro de cada grupo de vinhos considerado.

Nota-se no entanto que o ácido gálico e a quercetina foram os componentes individuais com maior correlação com a actividade antioxidante de vinhos tintos enquanto o ácido cafeico e o ácido ferúlico tiveram maior correlação com a actividade antioxidante de vinhos brancos. Os valores mais baixos das correlações dos teores de ácido cafeico com as actividades antioxidantes de vinhos brancos avaliadas pelos testes de DPPH, FRAP e Folin-Ciocalteu resultam não de uma dispersão dos resultados mas sim de dois comportamentos distintos para dois grupos de amostras dentro do conjunto dos vinhos brancos, ou seja, considerando cada um destes grupos em separado o teor de ácido cafeico apresentaria uma correlação moderada ou forte com a actividade antioxidante (Anexos II a V).

4 – Conclusões e Perspectivas futuras

A actividade antioxidante de 88 vinhos portugueses (63 tintos, 21 brancos e 4 rosés), produzidos entre 2006 e 2010, nas regiões vitivinícolas de Lisboa, Tejo e Península de Setúbal, foi determinada, tendo em conta características inerentes aos vinhos, como o tipo de vinho utilizado, o ano de produção, a região vitivinícola e as castas utilizadas para a sua produção.

Uma vez que a actividade antioxidante de uma matriz é uma propriedade multifactorial, que depende de vários componentes, realizaram-se diversos ensaios de forma a avaliar a capacidade antioxidante total do vinho. Este aspecto foi abordado ao analisar o seu poder de redução férrica, a sua actividade antiradicalar frente a um radical sintético, o DPPH, e frente ao anião superóxido. Determinou-se ainda a sua composição em fenólicos totais através do método de Folin-Ciocalteu e através da quantificação de determinados compostos fenólicos presentes no vinho.

A partir de todos os ensaios de determinação da actividade antioxidante, podemos concluir que existem diferenças claras de acordo com o tipo de vinho em questão, isto é, os vinhos tintos apresentam uma capacidade antioxidante superior à dos vinhos rosés, que por sua vez apresentam uma actividade antioxidante superior à dos vinhos brancos. Este facto é válido independentemente dos diferentes parâmetros tidos em conta, como a região e castas utilizadas para a produção do vinho, assim como a região vitivinícola de proveniência.

Os métodos de vinificação aparentam ser extremamente relevantes no que refere a actividade antioxidante de um vinho, o que se pode observar claramente com o caso dos vinhos rosés, que apesar de serem produzidos a partir de castas tintas, são sujeitos a processos de vinificação mais semelhantes, se não idênticos, aos dos vinhos brancos, apresentam constantemente propriedades antioxidantes inferiores aos dos vinhos tintos.

Este trabalho permite ainda concluir que a escolha da uva utilizada para a produção de um vinho não deve ser menosprezada uma vez que participa activamente na composição em agentes antioxidantes do vinho resultante. De facto, os vinhos rosés e brancos diferem essencialmente no tipo de uva utilizada para a sua produção, aspecto que se destaca nos ensaios de actividade antioxidante, onde os vinhos rosés apresentam sempre valores superiores aos dos vinhos brancos. Desta forma, podemos concluir que a uva tinta apresenta uma composição mais rica em agentes antioxidantes que são transmitidos ao vinho durante a sua produção do que a uva branca.

Por outro lado, um factor a ter em conta, e que participa na capacidade antioxidante dos vinhos, sobretudo dos vinhos tintos, é a casta utilizada para a produção do vinho. De facto, os vinhos produzidos a partir da casta Alicante Bouschet encontram-se no grupo de vinhos que revelam uma actividade antioxidante elevada nos diferentes ensaios realizados, indicando que a utilização desta

casta em particular traduz-se em vinhos com propriedades antioxidantes importantes. Também os vinhos produzidos a partir das castas Touriga Nacional e Petit Verdot apresentaram valores elevados de propriedades antioxidantes e de teor de compostos fenólicos.

Nos vinhos brancos, a escolha da casta parece não ser tão importante como o são os factores envolvidos com a região e os métodos de vinificação.

De maneira geral, os resultados obtidos para estes ensaios encontram-se nas gamas apresentadas por diversos autores, tanto para vinhos tintos como para vinhos brancos, ao considerar ensaios análogos.

Um dos principais aspectos que se destaca nos ensaios realizados, nomeadamente a nível de poder redutor férrico e actividade antiradicalar frente ao radical DPPH, é o comportamento dos vinhos brancos da Estremadura que apresentam consistentemente propriedades antioxidantes superiores aos vinhos brancos das restantes regiões vitivinícolas estudadas, independentemente do ano de produção ou o tipo de casta que os constitui. Assim, o solo, clima e eventualmente os processos de vinificação aplicados podem influenciar a composição final do vinho a nível de compostos redutores e antiradicalares. O facto deste comportamento não se verificar nos vinhos tintos parece indicar que o contacto prolongado entre massas e o mosto se sobrepõe aos factores geográficos e de processo que são determinantes para o vinho branco.

Uma das vertentes inovadoras do presente trabalho foi sem dúvida a determinação da actividade antiradicalar por fotoquimioluminescência, parecendo ser os primeiros resultados de actividade antiradicalar de vinhos brancos ou rosés relativamente ao anião superóxido que, do nosso conhecimento, foram obtidos. Lamentavelmente, o ensaio, da forma em que é comercializado, não pode ser aplicado a vinhos tintos pois existe um grande efeito de interferência da matriz invalidando qualquer resultado que se possa obter.

Os resultados obtidos a partir da reacção de Folin-Ciocalteu podem fornecer uma indicação geral das propriedades antioxidantes de um vinho, permitindo não só distinguir vinhos tintos de brancos mas fornecendo informação sobre o teor global de espécies fenólicas.

Os parâmetros de cor analisados servem essencialmente para monitorizar a evolução de um vinho tinto quando sujeito a condições particulares durante todo o seu processo de produção, no entanto, estes parâmetros também podem ser utilizados para evidenciar outras propriedades e efectuar uma comparação fácil entre diferentes vinhos. No presente trabalho, tendo em conta os vinhos apresentando uma maior actividade antioxidante, evidenciou-se que uma intensidade de cor elevada está relacionada com propriedades antioxidantes elevadas, assim como uma quantidade importante em determinados compostos fenólicos como o ácido gálico e a quercetina.

Um dos principais objectivos do presente trabalho residiu na comparação da actividade antiradicalar, a actividade redutora e o teor de compostos fenólicos totais de vinhos tintos e brancos da região de Lisboa e em testar a existência de relações lineares entre estas propriedades. Desta forma, o teor de compostos fenólicos dos vinhos tintos apresenta uma correlação positiva forte com o poder redutor destes vinhos bem como com a sua actividade de sequestração do radical DPPH, sendo que estes compostos apresentam uma maior actividade redutora do que antiradicalar.

Ao considerar a capacidade de sequestração do radical anião superóxido dos vinhos brancos, conclui-se que os compostos do vinho que apresentam esta actividade antiradicalar também possuem capacidade de redução férrica, ou seja, maior capacidade de transferir electrões para espécies oxidadas.

Outro objectivo do presente trabalho foi a comparação entre a actividade antioxidante (antiradicalar e redutora) e as absorvâncias aos comprimentos de onda correspondentes às cores amarela, vermelha e azul. Um aspecto interessante foi o facto de algumas espécies que contribuem para a cor vermelha dos vinhos tintos não contribuírem significativamente para as propriedades antioxidantes desses vinhos, ou seja, não é possível inferir a capacidade antioxidante de um vinho apenas pela sua coloração.

Por outro lado, a coloração azul do vinho tinto parece estar relacionado com os diferentes ensaios de actividade antioxidante realizados, o que evidencia a importância de espécies fenólicas que contribuem para a cor azul, como é o caso de diversas antocianinas, para a actividade antioxidante de vinhos tintos.

Outra vertente inovadora do presente trabalho foi a utilização dos somatórios das áreas dos cromatogramas de HPLC obtidos com detecção selectiva aos comprimentos de onda máximos de absorção de diversos compostos fenólicos.

Desta forma, conclui-se que, nos vinhos brancos, os ácidos benzóicos, monitorizados a comprimentos de onda de 280 nm, apresentam uma forte actividade redutora e forte actividade de sequestração do radical anião superóxido. Nos vinhos tintos, os ácidos benzóicos participam de maneira mais moderada na actividade redutora de sequestração do radical DPPH. Igualmente, os ácidos hidroxicinâmicos estão significativamente envolvidos com a actividade antioxidante dos vinhos brancos e tintos, evidenciando a importância destes compostos nas propriedades funcionais dos vinhos. Os flavonóis, monitorizados a um comprimento de onda de 360 nm, participam moderadamente nas propriedades antioxidante tanto dos vinhos brancos como dos vinhos tintos.

A nível de perspectivas futuras, seria interessante investir numa amostragem mais abrangente e representativa das regiões de Tejo e Península de Setúbal, mas também das restantes regiões

vitivinícolas portuguesas. Outro aspecto interessante seria um estudo mais aprofundado sobre vinhos rosés, e sobre a importância tanto dos métodos de vinificação como das uvas (mais precisamente as castas utilizadas para a produção dos vinhos) nos diferentes compostos que se encontram posteriormente no vinho que lhe conferem características nutraceuticas, nomeadamente a sua capacidade antioxidante.

5 – Bibliografia

Alén-Ruiz, F., García-Falcón, M.S., Pérez-Lamela, M.C., Martínez-Carballo, E. & Simal-Gándara, J. (2009). Influence of major polyphenols on antioxidant activity in Mencía and Brancellao red wines. *Food Chemistry*, 113, 53-60.

Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S., Bektaşoğlu, K., & Özyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assay applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12, 1496-1547.

Atanacković, M., Petrović, A., Jović, S., Gojković, L., Bursać, B.M. & Cvejić, J. (2012). Influence of winemaking techniques on the resveratrol content, total phenolic content and antioxidant potential of red wines. *Food Chemistry*, 131, 513-518.

Bargagli, E., Olivieri, C., Bennet, D., Prasse, A., Muller-Quernheim, J., & Rottoli, P. (2009). Oxidative stress in the pathogenesis of diffuse lung diseases: A review. *Respiratory Medicine*, 103, 1245-1256.

Benzie, I.F.F., & Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.

Brandolini, V., Fiore, C., Maietti, A., Tedeschi, P. & Romano, P. (2007). Influence of *Saccharomyces cerevisiae* strains on wine total antioxidant capacity evaluated by photochemiluminescence. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 581-586.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*, 28, 25-30.

Bravo, L., Goya, L. & Lecerri, E. (2007). LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. *Food Research International*, 40, 393-405.

Burin, V.M., Falcão, L.D., Chaves, E.S., Gris, E.F., Preti, L.F. & Bordignon-Luiz, M.T. (2010). Phenolic composition, colour, antioxidant activity and mineral profile of Cabernet Sauvignon wines. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 1505-1512.

Burton, G., Jauniaux, E. (2011). Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 25, 287-299.

Cadenas, C., & Packer, L. (2002). Handbook of Antioxidants. Chapter 20 – The Phenolic Wine Antioxidants. 2nd Ed. Marcel Dekker, Inc. New York.

Caillé, S., Samson, A., Wirth, J., Diéval, J.-B., Vidal, S. & Cheynier, V. (2010). Sensory characteristics changes of red Grenache wines submitted to different oxygen exposures pre and post bottling. *Analytica Chimica Acta*, 660, 35-42.

Casagrande, R., Georgettia, S.R., Verri Jr., W.A., Borina, M.F., Lopez, R.F.V. & Fonseca, M.J.V. (2007). "In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity". *International Journal of Pharmaceutics*, 328 (2), 183-190

Castellari, M., Sartini, E., Fabiani, A., Arfelli, G. & Amati, A. (2002). Analysis of wine phenolics by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column. *Journal of Chromatography A*, 973, 21-227.

Cejudo-Bastante, M.J., Hermosín-Gutiérrez, I. & Pérez-Coello, M.S. (2011a). Micro-oxygenation and oak chip treatment of red wines: Effects on colour-related phenolic, volatile composition and sensory characteristics. Part I: Petit Verdot wines. *Food Chemistry*, 124, 727-737.

Cejudo-Bastante, M.J., Hermosín-Gutiérrez, I. & Pérez-Coello, M.S. (2011b). Micro-oxygenation and oak chip treatment of red wines: Effects on colour-related phenolic, volatile composition and sensory characteristics. Part II: Merlot wines. *Food Chemistry*, 124, 738-748.

Cejudo-Bastante, M.J., Pérez-Coello, M.S. & Hermosín-Gutiérrez, I. (2011c). Effect of wine micro-oxygenation treatment and storage period on colour-related phenolics, volatile composition and sensory characteristics. *LWT – Food Science and Technology*, 44, 866-874.

Chinnici, F., Sonni, F., Natali, N., Galassi, S. & Riponi, C. (2009). Color features and pigment composition of Italian carbonic macerated red wines. *Food Chemistry*, 113, 651-657.

Chira, K., Pacella, N., Jourdes, M. & Teissedre, P.-L. (2011). Chemical and sensory evaluation of Bordeaux wines (Cabernet Sauvignon and Merlot) and correlation with wine age. *Food Chemistry*, 126, 1971-1977.

Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A.C.P., Tavares, R.M., Sousa, M. J., Agasse, A., Delrot, S. & Gerós, H. (2007). “Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality”. *Food 1(1)*, 1-22. Global Science Books

Di Majo, D., La Guardia, M., Giammanco, S., La Neve, L. & Giammanco, M. (2008). The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents. *Food Chemistry*, 111, 45-49.

Dias, J.F. (2009). Determinação dos conteúdos de resveratrol em vinhos tintos de duas regiões brasileiras. Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de mestre em Ciências.

Ducasse, M.-A., Canal-Llauberes, R.-M., Lumley, M., Williams, P., Souquet, J.-M., Fulcrand, H., Doco, T. & Cheynier, V. (2010). Effect of macerating enzyme treatment on the polyphenol and polysaccharide composition of red wines. *Food Chemistry*, 118, 369-376.

Edeas, M., Attaf, D., Mailfert, A., Nasu, M., & Joubet, R. (2010). Maillard Reaction, mitochondria and oxidative stress: Potential role of antioxidants. *Pathologie Biologie*, 58, 220-225.

Escudero-Gilete, M.L., González-Miret, M.L. & Heredia, F.J. (2010). Implications of blending wines on the relationship between the colour and the anthocyanic composition. *Food Research International*, 43, 745-752.

Fang, F., Li, J.-M., Q.-H. & Huang, W.-D. (2007). Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect on ageing. *Food Chemistry*, 101, 428-433.

Fang, F., Li, J.-M., Zhang, P., Tang, K., Wang, W., Pan, Q.-H. & Huang, W.-D. (2008). “Effects of grape variety, harvest date, fermentation vessel and wine ageing on flavonoid concentration in red wines”. *Food Research International*, 41, 53-60

Fernández-Mar, M.I., Mateos, R., García-Parrilla, M.C., Puertas, B. & Cantos-Villar, E. (2012). “Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review”. *Food Chemistry*, 130, 797-813

Fernández-Pachón, M.S., Villaño, D., Troncoso, A.M. & García-Parrilla, M.C. (2006). Determination of the phenolic composition of sherry and table white wines by liquid chromatography and their relation with antioxidant activity. *Analytica Chimica Acta*, 563, 101-108.

Fredstrom, S. (2002). Nitric Oxide, Oxidative Stress, and Dietary Antioxidants. *Nutrition*, 18, 537-539.

Gaté, L., Paul, J., Nguyen Ba, G., Tew, K., & Tapiero, H. (1999). Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed & Pharmacother*, 53, 169-180.

Ghiselli, A., Serafini, M., Maiani, G., Azzini, E., & Ferro-Luzzi, A. (1994). A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biology and Medicine*, 18, 29-36.

Ginjom, I., D'Arcy, B., Caffin, N. & Gidley, M. (2011). Phenolic compound profiles in selected Queensland red wines at all stages of the wine-making process. *Food Chemistry*, 125, 823-834.

Glories, Y. (1984). La couleur des vins rouges. Mesure, origine et interprétation. Partie II. *Connaiss. Vigne Vin*. 18, 253–271.

Gómez-Alonso, S., García-Romero & E., Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). "HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence". *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 618–626.

Gómez-Alonso, S., García-Romero, E. & Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 618-626.

González-del Pozo, A., Arozarena, I., Noriega, M.-J., Navarro, M. & Casp, A. (2010). Short- and long-term effects of micro-oxygenation treatments on the colour and phenolic composition of a Cabernet Sauvignon wine aged in barrels and/or bottles. *European Food Research and Technology*, 231, 589-601.

Grainger, K., & Tattersall, H. (2005). Food Industry Briefing Series – Wine production: vine to bottle. Blackwell Publishing, Ltd. Oxford. 1-96.

Granato, D., Katayama, F.C.U. & Castro, I.A. (2010). Assessing the association between phenolic compounds and the antioxidant activity of Brazilian red wines using chemometrics. *LTW – Food Science and Technology*, 43, 1542-1549.

Gris, E. F., Mattivi, F., Ferreira, E.A., Vrhovsek, U., Pedrosa, R.C. & Bordinon-Luiz, M. T. (2011). Proanthocyanidin profile and antioxidant capacity of Brazilian viti vinífera red wines. *Food Chemistry*, 126, 213-220.

Gülçin, I. (2006). "Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid)". *Toxicology*, 217, 213-220.

Gürbüz, O., Göçmen, D., Dağdelen, F., Gürsoy, M., Aydın, S., Şahin, İ., Büyükuysal, L. & Usta M. (2007). Determination of flavan-3-ols and trans-resveratrol in grapes and wine using HPLC with fluorescence detection. *Food Chemistry*, 100, 518-525.

Halliwell, B. (2011). Free radicals and antioxidants – *quo vadis?*. *Trends in Pharmacological Sciences*, 32, 125-130.

Hernanz, D., Gallo, V., Recamales, A.F., Meléndez-Martínez, A.J., González-Miret, M.L. & Heredia, F.J. (2009). Effect of storage on the phenolic content, volatile composition and colour of white wines from the varieties Zalema and Colombard. *Food Chemistry*, 113, 530-537.

<http://www.infovini.com>

<http://www.vinhosverdes.pt>

Huang, D., Ou, B., & Prior, R. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.

Itagaki, S., Kurokawa, T., Nakata, C., Saito, Y., Oikawa, S., Kobayashi, M., Hirano, T. & Iseki K. (2009). "In vitro and in vivo antioxidant properties of ferulic acid: A comparative study with other natural oxidation inhibitors". *Food Chemistry*, 114 (2), 466-471

Ivanova, V., Dörnyei, A., Márk, L., Vojnoski, B., Stafilov, T., Stefova & M., Kilár, F. (2011). "Polyphenolic content of Vranec wines produced by different vinification conditions". *Food Chemistry*, 124, 316-325

Jackson, R. (2008). Wine Science, Principles and Applications. 3rd Ed. Elsevier Inc. Burlington. 108-507.

Ji, H.-F., Zhang, H.-Y. & Shen L. (2006). "Proton dissociation is important to understanding structure-activity relationships of gallic acid antioxidants". *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 16 (15), 4095-4098

Kallithraka, S., Arvanitoyannis, I., El-Zajouli, A. & Kefalas, P. (2001). The application of an improved method for trans-resveratrol to determine the origin of Greek red wines. *Food Chemistry*, 75, 355-363.

Kallithraka, S., Salacha, M.I. & Tzourou, I. (2009). Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning test versus bottle storage. *Food Chemistry*, 113, 500-505.

Katalanić, V., Milos, M., Modun, D., Musić, I. & Boban, M. (2004). Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. *Food Chemistry*, 86, 593-600.

Kazakevich, Y., & Lobrutto, R. (2007). HPLC for Pharmaceutical Scientists – Part I – HPLC theory and practice. Wiley & Sons, Inc. New Jersey. 1-533.

Kohri, S., Fujii, H., Oowada, S., Endoh, N., Sueishi, Y., Kusakabe, M., Shimmei, M., & Kotake, Y. (2009). An oxygen radical absorbance capacity-like assay that directly quantifies the antioxidant's scavenging capacity against AAPH-derived free radicals. *Analytical Biochemistry*, 386, 167-171.

Kumar, A., Malik, A.K. & Tewary, D.K. (2009). A new method for determination of myricetin and quercetin using solid phase microextraction-high performance liquid chromatography-ultra violet/visible system in grapes, vegetables and red wine samples. *Analytica Chimica Acta*, 631, 177-181.

Li, H., Wang, X., Li, Y., Li, P. & Wang, H. (2009). Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. *Food Chemistry*, 112, 454-460.

Li, Z., Pan, Q., Jin, Z., Mu, L. & Duan, C. (2011). Comparison on phenolic compounds in Vitis vinifera cv. Cabernet Sauvignon wines from five wine-growing regions in China. *Food Chemistry*, 125, 77-83.

Limón-Pacheco, J., & Gensebatt, M. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research*, 674, 137-147.

Liu, Q., Cai, W. & Shao, X. (2008). Determination of seven polyphenols in water by high performance liquid chromatography combined with preconcentration. *Talanta*, 77, 679-683.

Lorenzo, C., Pardo, F., Zalacain, A., Alonso, G.L. & Salinas, M.R. (2008). Complementary effect of Cabernet Sauvignon on Monastrell wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 54-61.

Lucena, A.P.S., Nascimento, R.J.B., Maciel, J.A.C., Tavares, J.X., Barbosa-Filho, J.M. & Oliveira, E.J. (2010). Antioxidant activity and phenolics content of selected Brazilian wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 30-36.

Makris, D.P., Psarra, E. Kallithraka, S. & Kefala, P. (2003). The effect of polyphenolic composition as related to antioxidant capacity in white wines. *Food Research International*, 36, 805-814.

Mark, H. (2003). Encyclopedia of Polymer Science and Technology, Volume 1 - Chromatography – HPLC. 3rd Ed. John Wiley and Sons, Inc. New Jersey. 598-613.

McMaster, M. (2007). HPLC, A Practical User's Guide – HPLC Primer. 2nd Ed. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey. 1-15.

Mitić, M. N., Obradović, M. V., Grahovac, Z. B. & Pavlović, A. N. (2010). "Antioxidant capacities and phenolic levels of different varieties of Serbian white wines". *Molecules*, 15, 2016-2027

Moreno-Arribas, M., & Polo, M. (2009). Wine Chemistry and Biochemistry. Springer Science+Business Media. New York. 437-529.

Mulero, J., Pardo, F. & Zafrilla, P. (2009). Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant activity in conventional and organic red wines during storage. *European Food Research Technology*, 229, 807-812.

Munõz, S., Mestres, M., Busto, O. & Guasch, J. (2008). Determination of some flavan-3-ols and anthocyanins in red grape seed and skin extracts by HPLC-DAD: Validation study and response comparison of different standards. *Analytica Chimica Acta*, 628, 104-110.

Orduña, R.M. (2010). "Climate change associated effects on grape and wine quality and production". *Food Research International*, 43, 1844-1855

Özkan, G. & Göktürk Baydar, N. (2006). A direct RP-HPLC determination of phenolic compounds in Turkish red wines. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19 (2), 229-234.

Paixão, N., Perestrelo, R., Marques, J.C. & Câmara, J.S. (2007). Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red rosé and white wines. *Food Chemistry*, 105, 204-214.

Paulo, L., Domingues, F., Queiroz, J.A. & Gallardo, E. Development and validation of an analytical method for the determination of trans- and cis-resveratrol in wine: analysis of its contents in 186 Portuguese red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2157-2163.

Pérez-Lamela, C., García-Falcón, M.S., Simal-Gándara, J. & Orriols-Fernández, I. (2007). Influence of grape variety, vine system and enological treatments on the colour stability of young red wines. *Food Chemistry*, 101, 601-606.

Pérez-Magariño, S. & González-San José, M.L. (2006). Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chemistry*, 96, 197-208.

Pinzani, P., Petruzzi, E., Magnolfi, S.U., Malentacchi, F., De Siena, G., Petruzzi, I., Motta, M., Malaguarnera, M., Marchionni, N. & Pazzagli, M. (2010). “Red or white wine assumption and serum antioxidant capacity”. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 51, 72-74

Porgali, E. & Büyüktuncel, E. (2012). Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of native red wines by high performance liquid chromatography and spectrophotometric methods. *Food Research International*, 45, 145–154.

Portaria nº1197/2006 de 7 de Novembro

Portaria nº1203/2006 de 9 de Novembro

Portaria nº163/2011 de 18 de Abril

Portaria nº238-A/2011 de 16 de Junho

Portaria nº276/2010 de 19 de Maio

Portaria nº393/2001 de 16 de Abril

Portaria nº426/2009 de 23 de Abril

Portaria nº445/2009 de 27 de Abril

Portaria nº593/2010 de 29 de Julho

Portaria nº695/2009 de 29 de Junho

Portaria nº817/2006 de 16 de Agosto

Portaria nº853/2004 de 19 de Julho

Portaria nº86/2004 de 2 de Abril

Prior, R., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Food and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4306.

Ratola, N., Faria, J.L. & Alves, A. (2004). Analysis and quantification of trans-resveratrol in wines from Alentejo region (Portugal). *Food Technology and Biotechnology*, 42 (2), 125-130.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1998). Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.

Ribeiro de Lima, M.T., Waffo-Tégou, P., Teissedre, P.L., Pujolas, A., Vercauteren, J., Cabanis, J.C. & Mérillon, J.M. (1999). Determination of stilbenes (*trans*-astrigin, *cis*- and *trans*-piceid, and *cis*- and *trans*-resveratrol) in Portuguese wines. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47, 2666-2670.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006a). Handbook of Enology, Volume 1, The Microbiology of Wine and Vinifications. 2nd Ed. John Wiley and Sons, Ltd. West Sussex. 327-480.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006b). Handbook of Enology, Volume 2, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. 2nd Ed. John Wiley and Sons, Ltd. West Sussex.141-205.

Rivero-Pérez, M.D., Muñiz, P. & González-Sanjosé, M.L. (2008). Contribution of anthocyanin fraction to the antioxidant properties of wine. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2815-2822.

Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A., Lage-Yusty, M.A. & López-Hernández, J. (2009). HPLC-analysis of polyphenolic compounds in Spanish white wines and determination of their antioxidant activity by radical scavenging assay. *Food Research International*, 42, 1018-1022.

Roussis, I.G., Lambropoulos, I., Tzimas, P., Gkoulioti, A., Marinos, V., Tsoupeis, D. & Boutaris, I. (2008). Antioxidant activities of some Greek wines and wine phenolic extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 614-621.

Salaha, M.-I., Kallithraka, S., Marmaras, I., Koussissi, E. & Tzourou, I. (2008). A natural alternative to sulphur dioxide for red wine production: Influence on colour, antioxidant activity and anthocyanin content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 660-666.

Sandler, M., & Pinder, R. (2003). Wine, a Scientific Exploration. Taylor and Francis Group. London and New York.140-228.

Scheibmeir, H., Christensen, K., Whitaker, S., Jegaethesan, J., Clancy, R., & Pierce, J. (2005). A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive and Critical Care Nursing*, 21, 24-28.

Šeruga, M., Novak, I. & Jakobek, L. (2011). Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, 124, 1208-1216.

Silva, L.R., Andrade, P. B., Valentão, P., Seabra, R.M., Trujillo, M. E. & Velázquez, E. (2005). "Analysis of non-coloured phenolics in red wine: Effect of *Dekkera bruxellensis* yeast". *Food Chemistry*, 89, 185-189

Souto, A.A., Carneiro, M.C., Seferim, M., Senna, M.J.H., Conz, A. & Gobbi, K. (2001). Determination of trans-resveratrol concentrations in Brazilian red wines by HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14, 441-445.

Staško, A., Brezová, V., Mazúra M., Čertík, M., Kaliňák, M. & Gescheidt, G. (2008).A comparative study on the antioxidant properties of Slovakian and Austrian wines. *LTW – Food Science and Technology*, 41, 2126-2135.

Sun, B., Ribes, A. M., Leandro, M. C., Belchior, A. P. & Spranger, M. I. (2006). "Stilbenes: Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation". *Analytica Chimica Acta*, 563, 382-390.

Tenore, G.C., Troisi, J., Di Fiore, R., Manfra, M. & Novellino, E. (2011). Nutraceutical value and toxicological profile of selected red wines from Morocco. *Food Chemistry*, 129, 792-798.

Tirzitis, G., & Bartosz, G. (2010). Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta Biochimica Polonica*, 57, 139-142.

Tsanova-Savova, S., Dimov, S. & Ribarova, F. (2002). Anthocyanins and color variables of Bulgarian aged red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15, 647-654.

Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1-40.

Versari, A., Parpinello, G.P., Scazzina, F. & Del Rio, D. (2010). Prediction of total antioxidant capacity of red wine by Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Control*, 21, 786-789.

Villaño, D., Fernández-Pachón, M.S., Troncoso, A.M. & García-Parrilla, M.C. (2004). The antioxidant activity of wines determined by the ABTS⁺ method: influence of sample dilution and time. *Talanta*, 64, 501-509.

Vrček, I.V., Bojić, M., Züntar, I., Mendaš, G. & Medić-Šaric, M. (2011). Phenol content, antioxidant activity and metal composition of Croatian wines, deriving from organically and conventionally grown grapes. *Food Chemistry*, 124, 354-361.

Wang, C., Chu, C., Chu, K., Choy, K., Khaw, K., Rogers, M., & Pang, C. (2004). Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity Assay Versus Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay in Plasma. *Clinical Chemistry*, 50, 952-954.

Woraratphoka, J., Intarapichet, K.-O. & Indrapichate, K. (2007). Phenolic compounds and antioxidative properties of selected wines from the northeast of Thailand. *Food Chemistry*, 104, 1485-1490.

Wu, D., & Cederbaum, A. (2003). Alcohol, Oxidative Stress, and Free Radical Damage. *Alcohol, Research and Health*, 27, 277-284.

Yang, J., Martinson, T., & Liu, R. (2009). Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. *Food Chemistry*, 116, 332-339.

Anexo I – Lista das castas tintas e brancas autorizadas por região vitivinícola

Região	Castas Tintas autorizadas	Castas Brancas autorizadas
Vinhos Verdes ou Minho (Portaria nº393/2001 de 16 de Abril)	Alfroucheiro, Alicante Bouschet, Alvarelhão, Amaral, Aragonez, Baga, Borraçal, Cabernet-Franc, Cabernet-Sauvignon, Castelão, Doçal, Doce, Espadeiro, Espadeiro-Mole, Grand-Noir, Jaen, Labrusco, Merlot, Mourisco, Padeiro, Pedral, Pical, Pinot-Noir, Rabo-de-Anho, Sousão, Syrah, Tinta-Barroca, Touriga-Nacional, Trincadeira, Verdelho-Tinto, Verdial-Tinto e Vinhão	Alvarinho, Arinto, Avesso, Azal, Batoca, Caínho, Cascal, Chardonnay, Chenin, Colombard, Diagalves, Esganinho, Esganoso, Fernão-Pires, Folgasão, Godelho, Lameiro, Loureiro, Malvasia-Fina, Malvasia-Rei, Müller-Thurgau, Pinot-Blanc, Pintosa, Rabo-de-Ovelha, Riesling, São Mamede, Semilão, Sercial, Tália, Trajadura e Viosinho
Terras do Dão (Portaria nº593/2010 de 29 de Julho)	Água-Santa, Alfrocheiro, Alicante-Bouschet, Amaral, Alvarelhão, Aragonez, Azal, Baga, Bastardo, Cabernet-Franc, Cabernet-Sauvignon, Camarate, Campanário, Castelão, Cidreiro, Coração-de-Galo, Cornifesto, Grand-Noir, Jaen, Malvasia-Preto, Marufo, Merlot, Monvedro, Moreto, Pilongo, Pinot-Noir, Português-Azul, Rabo-de-Ovelha-Tinto, Rufete, Syrah, Tinta-Carvalha, Tinta-Francisca, Tintem, Tinto-Cão, Touriga-Fêmea, Touriga-Franca, Touriga-Nacional, Trincadeira e Vinhão	Alicante-Branco, Alvar, Alvarinho, Arinto, Arinto-do-Interior, Assarak, Barcelo, Bical, Cercial, Chardonnay, Dona-Branca, Encruzado, Fernão-Pires, Folgasão, Folha-de-Figueira, Fonte-Cal, Gouveio, Jampal, Loureiro, Luzidio, Malvasia-Fina, Malvasia-Rei, Pinot-Blanc, Rabo-de-Ovelha, Riesling, Sauvignon, Semillon, Sercial, Sercialinho, Sória, Tália, Tamarez, Terrantez, Uva-Cão, Verdelho, Verdial-Branco, Viosinho e Vital
Terras da Beira (Portaria nº163/2011 de 18 de Abril)	Água-Santa, Alfrocheiro, Alicante-Bouschet, Alvarelhão, Aragonez, Azal, Baga, Bastardo, Cabernet-Franc, Cabernet-Sauvignon, Camarate, Campanário, Castelão, Grand-Noir, Jaen, Malvasia-Preto, Marufo, Merlot, Monvedro, Moreto, Pilongo, Pinot-Noir, Português-Azul, Rabo-de-Ovelha-Tinto, Rufete, Sousão, Syrah, Tinta-Barroca, Tinta-Carvalha, Tinta-Francisca, Tinto-Cão, Touriga-Fêmea, Touriga-Franca, Touriga-Nacional, Trincadeira e Vinhão	Alicante-Branco, Alvar, Alvarinho, Arinto, Arinto-do-Interior, Barcelo, Bical, Cercial, Chardonnay, Dona-Branca, Encruzado, Fernão-Pires, Folgasão, Folha-de-Figueira, Fonte-Cal, Gouveio, Loureiro, Malvasia-Fina, Malvasia-Rei, Pinot-Blanc, Rabo-de-Ovelha, Riesling, Sauvignon, Semillon, Sercial, Sercialinho, Sória, Tália, Tamarez, Terrantez, Uva-Cão, Verdelho, Verdial-Branco, Viosinho e Vital
Lisboa (Portaria nº426/2009 de 23 de Abril)	Alfrocheiro, Alicante-Bouschet, Amostrinha, Aragonez, Baga, Bastardo, Bonvedro, Cabernet-Franc, Cabernet-Sauvignon, Cabinda, Caladoc, Camarate, Carignan, Castelão, Cinsaut, Grand-Noir, Grenache, Grossa, Jaen, Merlot, Molar, Monvedro, Moreto, Negra-Mole, Parreira-Matias, Petit-Verdot, Pinot-Noir, Preto-Cardana, Preto-Martinho, Ramisco, Rufete, Sousão, Syrah, Tannat, Tinta-Barroca, Tinta-Caiada, Tinta-Carvalha, Tinta-Lisboa, Tinta-Miúda, Tinta-Pomar, Tintinha, Tinto-Cão, Touriga-Franca, Touriga-Nacional, Trincadeira, Valbom e Zinfandel	Alicante-Branco, Almafra, Alvaldurão, Alvarinho, Antão-Vaz, Arinto, Bical, Boal-Branco, Boal-Espinho, Cerceal-Branco, Cercial, Chardonnay, Chenin, Diagalves, Fernão-Pires, Encruzado, Galego-Dourado, Jampal, Loureiro, Malvasia, Malvasia-Fina, Malvasia-Rei, Marquinhas, Moscatel-Graúdo, Pinot-Blanc, Rabo-de-Ovelha, Ratinho, Riesling, Sauvignon, Seara-Nova, Semillon, Sercial, Tália, Sória, Tamarez, Trincadeira-Branca, Trincadeira-das-Pratas, Verdelho, Viognier, Viosinho e Vital
Alentejo (Portaria nº276/2010 de 19 de Maio)	Alfrocheiro, Alicante-Bouschet, Aragonez, Baga, Cabernet-Sauvignon, Caladoc, Carrignan, Castelão, Cinsaut, Corropio, Grand-Noir, Grenache, Grossa, Manteúdo-Preto, Merlot, Moreto, Petit-Verdot, Pinot-Noir, Syrah, Tannat, Tinta-Barroca, Tinta-Caiada, Tinta-Carvalha, Tinta-Miúda, Tinto-Cão, Touriga-Franca, Touriga-Nacional, Trincadeira e Zinfandel	Alicante-Branco, Alvarinho, Antão-Vaz, Bical, Chardonnay, Chasselas, Diagalves, Encruzado, Fernão-Pires, Gouveio, Larião, Malvasia-Fina, Malvasia-Rei, Manteúdo, Moscatel-Graúdo, Mourisco-Branco, Perrum, Rabo-de-Ovelha, Riesling, Sauvignon, Semillon, Sercial, Sória, Tália, Tamarez, Trincadeira-das-Pratas, Verdelho, Viognier e Viosinho
Tejo (Portaria nº445/2009 de 27 de Abril)	Alfrocheiro, Alicante-Bouschet, Amostrinha, Aragonez, Baga, Bastardo, Bonverdo, Cabernet-Franc, Cabernet-Sauvignon, Cabinda, Caladoc, Camarate, Carignan, Castelão, Cinsaut, Grand-Noir, Grenache, Grossa, Jaen, Merlot, Molar, Monvedro, Moreto, Negra-Mole, Parreira-Matias, Petit-Verdot, Pinot-Noir, Preto-Cardana, Preto-Martinho, Ramisco, Rufete, Sousão, Syrah, Tannat, Tinta-Barroca, Tinta-Caiada, Tinta-Carvalha, Tinta-Miúda, Tinta-Pomar, Tintinha, Tinto-Cão, Touriga-Franca, Touriga-Nacional, Trincadeira e Valbom	Alicante-Branco, Almafra, Alvaldurão, Alvarinho, Antão-Vaz, Arinto, Bical, Boal-Branco, Boal-Espinho, Cerceal-Branco, Cercial, Chardonnay, Chenin, Còdega-de-Larinho, Diagalves, Encruzado, Fernão-Pires, Galego-Dourado, Gouveio, Jampal, Loureiro, Malvasia, Malvasia-Fina, Malvasia-Rei, Marquinhas, Moscatel-Galego-Branco, Moscatel-Graúdo, Pinot-Blanc, Riesling, Ratinho, Rabo-de-Ovelha, Sauvignon, Seara-Nova, Semillon, Sercial, Sória, Tália, Tamarez, Trincadeira-das-Pratas, Trincadeira-Branca, Verdelho, Viognier, Viosinho e Vital

Lista das castas tintas e brancas autorizadas por região vitivinícola (cont. 1)

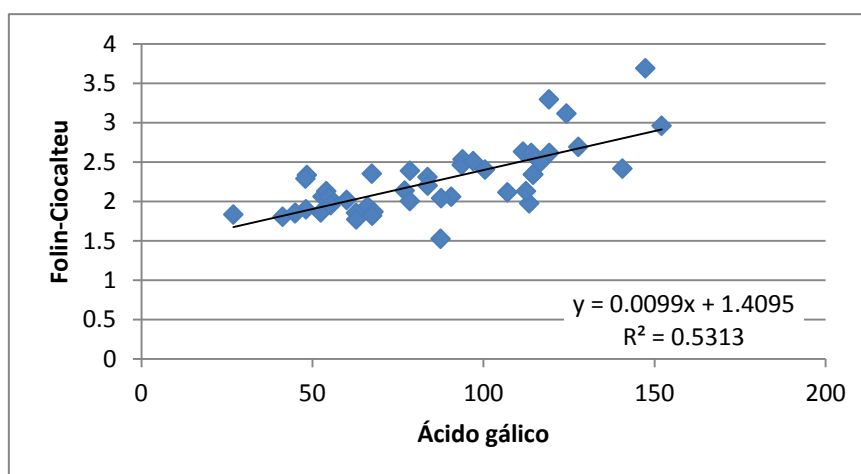
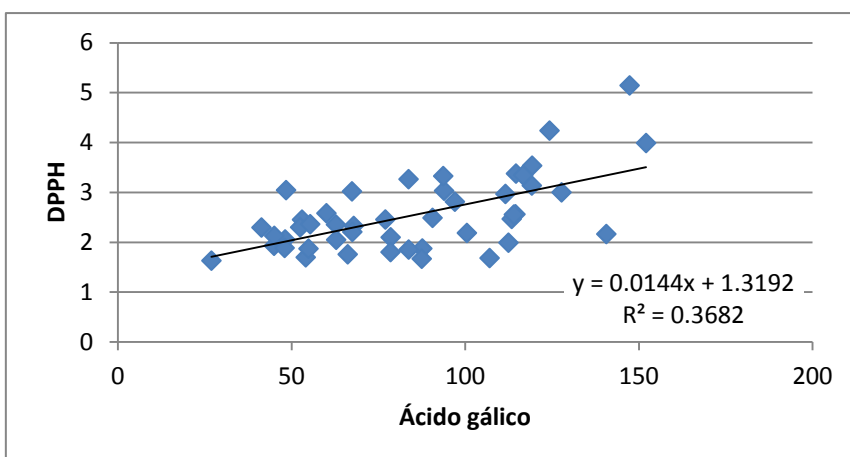
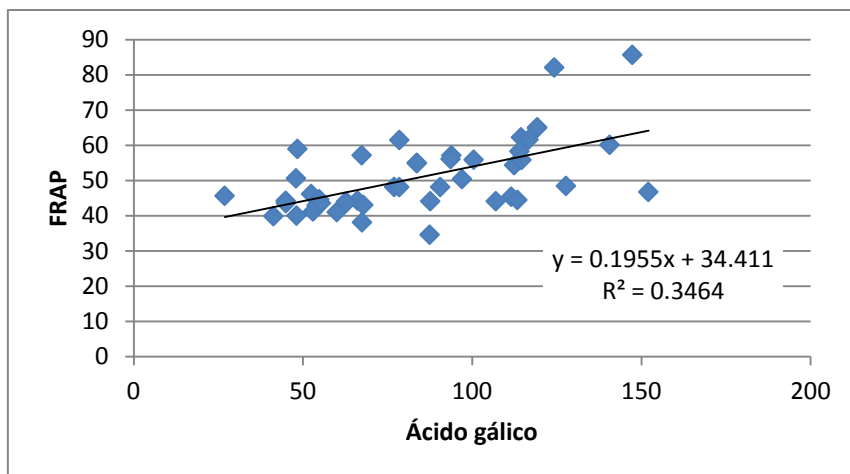
<p>Península de Setúbal (Portaria nº695/2009 de 29 de Junho)</p>	<p>Alfrocheiro, Alicante-Bouschet, Alvarelhão, Alvarelhão-Ceitão, Amaral, Amor-Não-Me-Deixes, Amostrinha, Aragonez, Aramon, Arjunção, Baga, Barca, Barreto, Bastardo, Bastardo-Tinto, Bonvedro, Borraçal, Bragão, Branjo, Cabernet-Franc, Cabernet-Sauvignon, Caladoc, Calrão, Camarate, Carignan, Carrega-Burros, Carrega-Tinto, Casculho, Castelã, Castelão, Castelino, Castelo, Cidadelhe, Cidreiro, Cinsaut, Concieira, Coração-de-Galo, Cornifesto, Corropio, Corvo, Doçal, Doce, Donzelinho-Tinto, Engomada, Esgana-Cão-Tinto, Espadeiro, Espadeiro-Mole, Farinheira, Ferral, Galego, Gamay, Gonçalo-Pires, Gorda, Gouveio Preto, Graciosa, Grand-Noir, Grangeal, Grenache, Grossa, Jaen, Labrusco, Lourela, Malandra, Malvarisco, Malvasia-Preta, Manteúdo-Preto, Mário-Feld, Marufo, Melhorio, Melra, Merlot, Molar, Mondet, Monvedro, Moreto, Moscatel-Galego-Tinto, Mourisco, Mourisco-de-Semente, Mourisco-de-Trevões, Negra-Mole, Nevoeira, Padeiro, Parreira-Matias, Patorra, Pau-Ferro, Pedral, Pêro-Pinhão, Petit-Bouschet, Petit-Verdot, Pexem, Pical, Pílongo, Pinot-Noir, Português-Azul, Preto-Cardana, Preto-Martinho, Rabo-de-Anho, Rabo-de-Lobo, Rabo-de-Ovelha-Tinto, Ramisco, Ramisco-Tinto, Ricoca, Rodo, Roseira, Rufete, Saborinho, Santareno, São-Saul, Sevilhão, Sousão, Syrah, Tannat, Teinturier, Tinta, Tinta-Aguiar, Tinta-Aurélius, Tinta-Barroca, Tinta-Bastardinha, Tinta-Caiada, Tinta-Carvalha, Tinta-Fontes, Tinta-Francisca, Tinta-Lameira, Tinta-Lisboa, Tinta-Martins, Tinta-Mesquita, Tinta-Miúda, Tinta-Negra, Tinta-Penajoia, Tinta-Pereira, Tinta-Pomar, Tinta-Porto-Santo, Tinta-Tabuaço, Tintinha, Tinto-Cão, Tinto-Sem-Nome, Touriga-Fêmea, Touriga-Franca, Touriga-Nacional, Transâncora, Trincadeira, Valdosa, Varejoa, Verdelho-Tinto, Verdial-Tinto, Vinhão, Xara, Zé-do-Telheiro e Zinfandel</p>	<p>Almenhaca, Alvadurão, Alvar, Alvarelhão-Branco, Alvarinho, Antão-Vaz, Arinto, Arinto-do-Interior, Arns-Burguer, Avesso, Azal, Babosa, Barcelo, Bastardo-Branco, Batoca, Beba, Bical, Boal-Barreiro, Boal-Branco, Boal-Espinho, Branco-Desconhecido, Branco-Especial, Branco-Gouvães, Branco-Guimarães, Branco-João, Branda, Budelho, Cainho, Caracol, Caramela, Carão-de-Moça, Carrasquenho, Carrega-Branco, Cascal, Castelão-Branco, Castelo-Branco, Cerceal-Branco, Cercial, Chardonnay, Chasselas, Chasselas-Sabor, Chasselas-Salsa, Chenin, Códaga-de-Larinho, Colombard, Cornichon, Corval, Crato-Espanhol, Dedo-de-Dama, Diagalves, Dona-Branca, Dona-Joaquina, Donzelinho-Branco, Dorinto, Encruzado, Esganinho, Esganoso, Estreito-Macio, Fernão-Pires, Folgasão, Folha-de-Figueira, Fonte-Cal, Galego-Dourado, Gigante, Godelho, Gouveio, Gouveio-Estimado, Gouveio-Real, Granho, Jacquere, Jampal, Lameiro, Larião, Leira, Lilás, Loureiro, Luzidio, Malvasia, Malvasia-Bianca, Malvasia-Branca, Malvasia-Branca-de-São-Jorge, Malvasia-Cândida, Malvasia-Fina, Malvasia-Parda, Malvasia-Rei, Malvasia-Romana, Manteúdo, Molinha, Moscadet, Moscatel-Galego-Branco, Moscatel-Graúdo, Moscatel-Nunes, Mourisco-Branco, Müller-Thurgau, Pé-Comprido, Perigo, Perrum, Pinheira-Branca, Pinot-Blanc, Pintosa, Praça, Promissão, Rabigato, Rabigato-Franco, Rabigato-Moreno, Rabo-de-Ovelha, Ratinho, Riesling, Roupeiro-Branco, Sabro, Santoal, São-Mamede, Sarigo, Sauvignon, Semilão, Semillon, Sercial, Sória, Tália, Tamarez, Terrantez, Terrantez-da-Terceira, Terrantez-do-Pico, Touriga-Branca, Trajadura, Trincadeira-Branca, Trincadeira-das-Pratas, Uva-Cão, Uva-Cavaco, Uva-Salsa, Valente, Valveirinho, Vencedor, Verdelho, Verdial-Branco, Viognier, Viosinho e Vital</p>
<p>Algarve (Portaria nº817/2006 de 16 de Agosto)</p>	<p>Alfrocheiro, Alicante-Bouschet, Aragonez, Baga, Bastardo, Cabernet-Sauvignon, Caladoc, Castelão, Cinsaut, Grand-Noir, Grenache, Merlot, Monvedro, Moreto, Moscatel-Galego-Tinto, Negra-Mole, Pau-Ferro, Petit-Verdot, Pexem, Pinot-Noir, Syrah, Tinta-Barroca, Tinta-Caiada, Tinta-Carvalha, Tinto-Cão, Touriga-Franca, Touriga-Nacional e Trincadeira</p>	<p>Alicante-Branco, Antão-Vaz, Arinto, Chardonnay, Diagalves, Fernão-Pires, Malvasia-Fina, Malvasia-Rei, Manteúdo, Moscatel-Graúdo, Perrum, Rabo-de-Ovelha, Riesling, Sauvignon, Sória, Tália, Terrantez, Tamarez, Trincadeira-das-Pratas, Verdelho e Viognier</p>
<p>Açores (Portaria nº853/2004 de 19 de Julho)</p>	<p>Agronómica, Aragonez, Cabernet-Franc, Cabernet-Sauvignon, Castelão, Complexa, Merlot, Pinot-Noir, Rufete, Saborinho, Tinta-Barroca, Touriga-Franca, Touriga-Nacional e Vinhão</p>	<p>Arinto, Bical, Chardonnay, Fernão-Pires, Galego-Dourado, Generosa, Gouveio, Malvasia, Malvasia-Fina, Moscatel-Graúdo, Riesling, Rio-Grande, Seara-Nova, Sercial, Tália, Terrantez, Verdelho e Viosinho</p>
<p>Madeira (Portaria nº86/2004 de 2 de Abril)</p>	<p>Aragonez, Bastardo, Cabernet-Sauvignon, Complexa, Deliciosa, Malvasia-Roxa, Tinta-Barroca, Merlot, Tinta-Negra-Mole, Touriga-Franca, Touriga-Nacional e Sirah</p>	<p>Arinto, Arns-Burger, Boal, Carão-de-Moça, Chardonnay, Chenin-Blanc, Malvasia-Cândida, Malvasia-Fina, Malvasia-de-São-Jorge, Sauvignon-Blanc, Sercial, Terrantez, Ugni-Blanc e Verdelho</p>
<p>Trás-os-Montes (Portaria nº1203/2006 de 9 de Novembro)</p>	<p>Alicante-Bouschet, Alvarelhão, Aragonez, Aramon, Bastardo, Cabernet-Sauvignon, Cabernet-Franc, Camarate, Carignan, Castelão, Cornifesto, Donzelinho-Tinto, Gamay, Gorda, Grand-Noir, Jaen, Malvasia-Preta, Marufo, Merlot, Moscatel-Galego-Tinto, Mourisco-de-Semente, Mourisco-de-Trevões, Pinot-Noir, Rufete, Sousão, Syrah, Tinta-Barroca, Tinta-Carvalha, Tinta-Francisca, Tinto-Cão, Touriga-Franca, Touriga-Nacional, Trincadeira e Vinhão</p>	<p>Arinto, Bical, Branda, Carrega-Branco, Cercial, Chardonnay, Chasselas, Códaga-de-Larinho, Dona-Branca, Donzelinho-Branco, Dorinto, Fernão-Pires, Folgasão, Godelho, Gouveio, Malvasia-Fina, Malvasia-Parda, Malvasia-Rei, Moscadet, Moscatel-Galego-Branco, Mourisco-Branco, Pinheira-Branca, Pinot-Blanc, Rabigato, Riesling, Sauvignon, Semillon, Sercial, Sória, Tamarez, Verdelho, Viosinho e Vital</p>

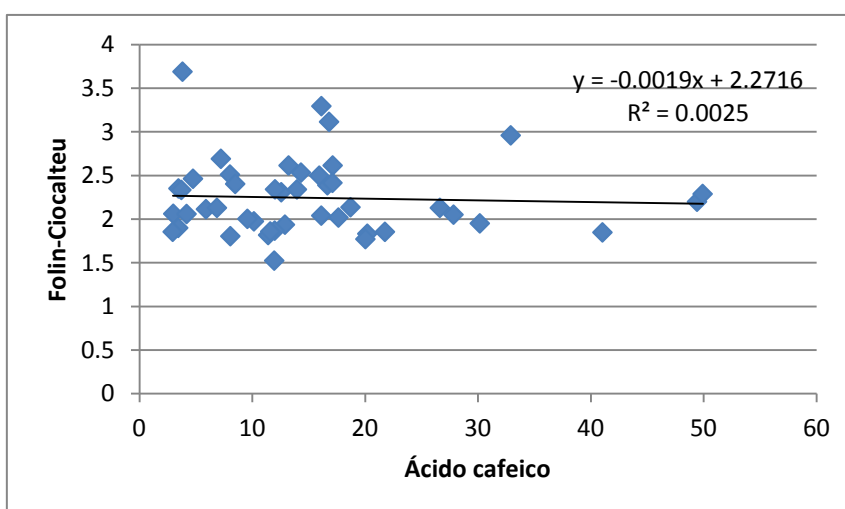
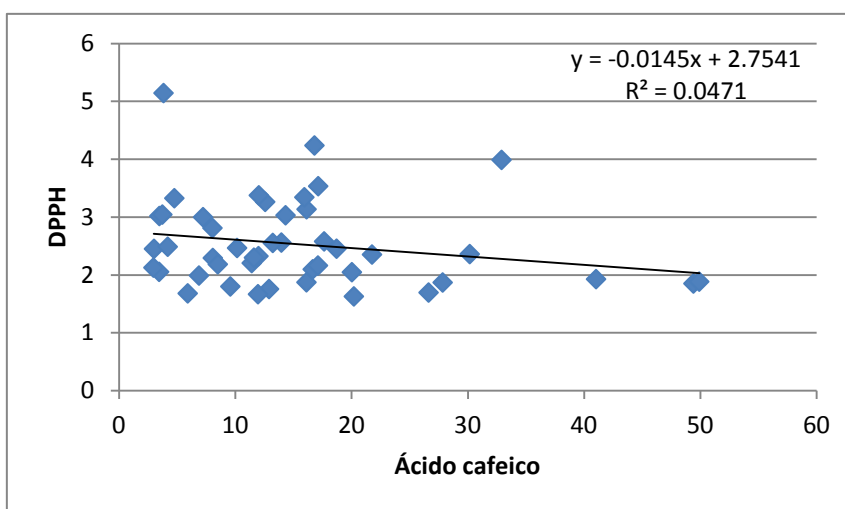
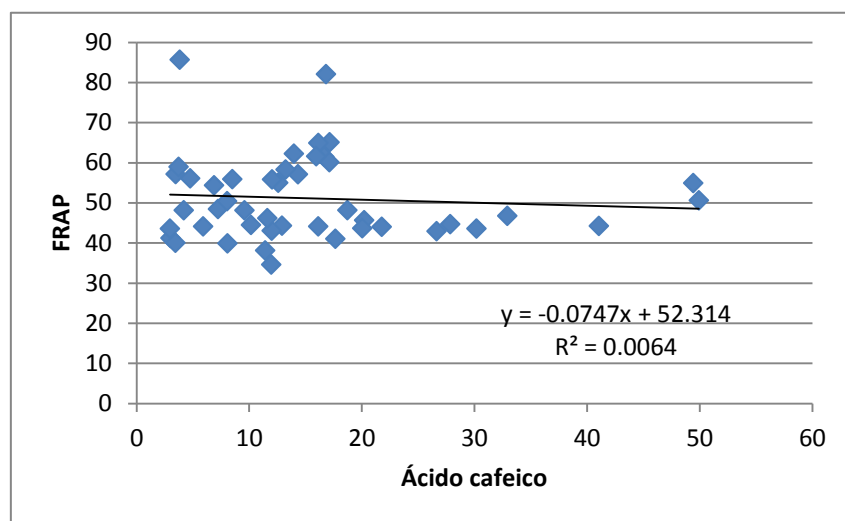
Lista das castas tintas e brancas autorizadas por região vitivinícola (cont. 2)

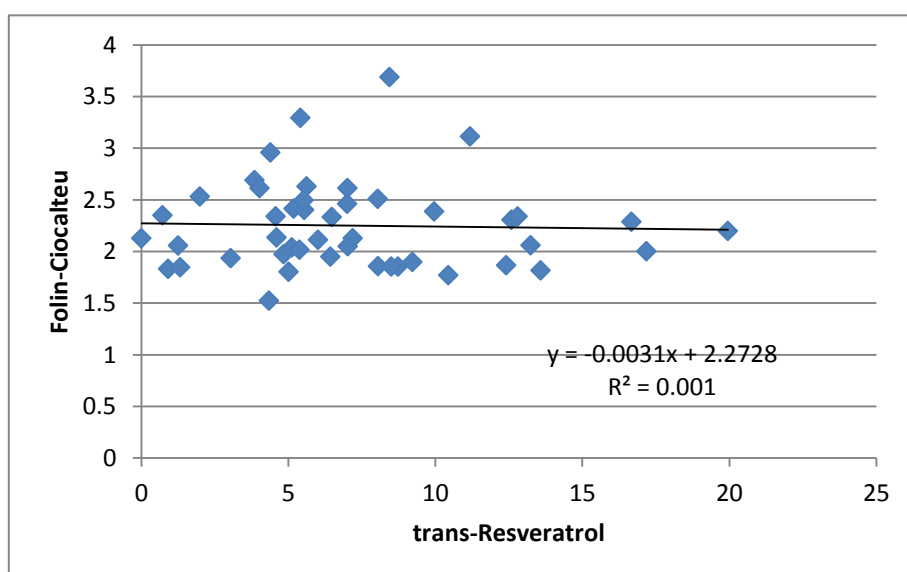
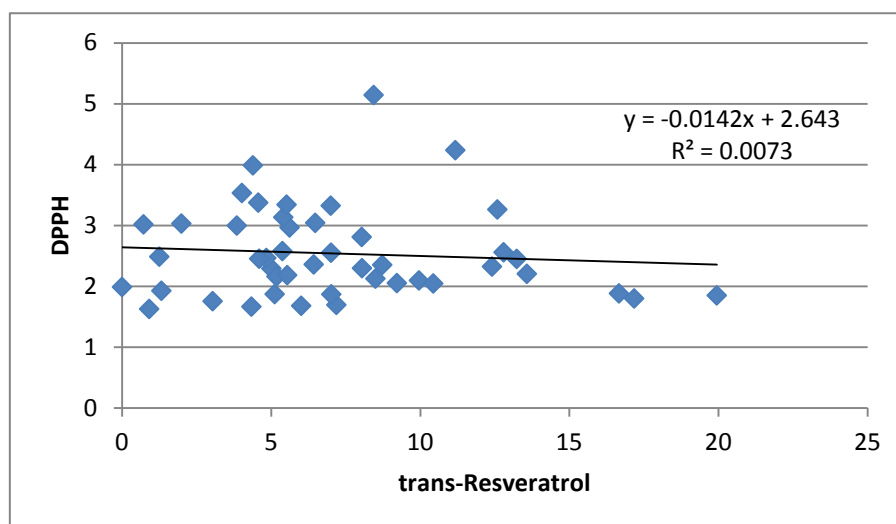
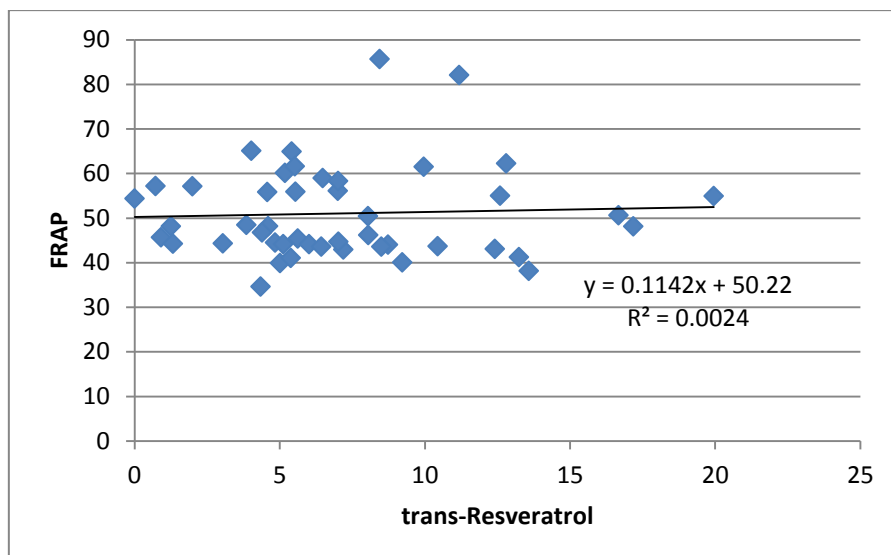
<p>Terras Durienses (Portaria nº1197/2006 de 7 de Novembro)</p>	<p>Alicante-Bouschet, Alvarelhão, Alvarelhão-Ceitão, Aragonez, Aramon, Baga, Barca, Barreto, Bastardo, Bragão, Cabernet-Franc, Cabernet-Sauvignon, Camarate, Carignan, Carrego-Tinto, Casculho, Castelã, Castelão, Cidadelhe, Concieira, Cornifesto, Corropio, Donzelinho-Tinto, Engomada, Espadeiro, Gamay, Gonçalves-Pires, Gorda, Grand-Noir, Grangeal, Grenache, Jaen, Lourela, Malandra, Malvasia-Preta, Marufo, Melra, Merlot, Mondet, Moscatel-Galego-Tinto, Mourisco-de-Semente, Mourisco-de-Trevões, Nevoeira, Patorra, Petit-Bouschet, Petit-Verdot, Pinot-Noir, Português-Azul, Preto-Marinheiro, Ricoca, Roseira, Rufete, Santareno, São-Saul, Sevilhão, Sousão, Syrah, Tannat, Tinta-Aguiar, Tinta-Barroca, Tinta-Carvalha, Tinta-Fontes, Tinta-Francisca, Tinta-Lameira, Tinta-Martins, Tinta-Mesquita, Tinta-Penajoia, Tinta-Pereira, Tinta-Pomar, Tinta-Tabuaço, Tinto-Cão, Tinto-Sem-Nome, Touriga-Fêmea, Touriga-Franca, Touriga-Nacional, Trincadeira, Valdeosa, Verejoa, Vinhão e Zinfandel</p>	<p>Alicante-Branco, Alvarelhão-Branco, Arinto, Avesso, Batoca, Bical, Branco-Especial, Branco-Guimarães, Branda, Caramela, Carrega-Branco, Cercial, Chardonnay, Chasselas, Chenin, Códaga-de-Larinho, Diagalves, Dona-Branca, Donzelinho-Branco, Dorinto, Estreito-Macio, Fernão-Pires, Folgasão, Godelho, Gouveio, Gouveio-Estimado, Gouveio-Real, Jampal, Malvasia-Fina, Malvasia-Parda, Malvasia-Rei, Moscadet, Moscatel-Galego-Branco, Mourisco-Branco, Müller-Thurgau, Pé-Comprido, Pinheira-Branca, Pinot-Blanc, Praça, Rabigato, Rabigato-Franco, Rabigato-Moreno, Rabo-de-Ovelha, Ratinho, Riesling, Samarrinho, Sarigo, Sauvignon, Semillon, Sercial, Sória, Tália, Tamarez, Terrantez, Touriga-Branca, Trigueira, Valente, Verdelho, Verdial-Branco, Viognier, Viosinho e Vital</p>
<p>Beira Atlântica (Portaria nº238- A/2011 de 16 de Junho)</p>	<p>Água-Santa, Alfrocheiro, Alicante-Bouschet, Alvarelhão, Aragonez, Baga, Bastardo, Cabernet-Franc, Cabernet-Sauvignon, Caladoc, Camarate, Campanário, Castelão, Cidreiro, Cinsault, Coração-de-Galo, Cornifesto, Espadeiro, Gamay, Grand-Noir, Jaen, Malvasia-Preta, Marufo, Merlot, Monvedro, Moreto, Petit-Verdot, Pilongo, Pinot-Noir, Português-Azul, Rabo-de-Ovelha-Tinto, Rufete, Sousão, Syrah, Tannat, Tinta-Barroca, Tinta-Carvalha, Tinta-Francisca, Tinta-Miúda, Tintem, Tinto-Cão, Touriga-Fêmea, Touriga-Franca, Touriga-Nacional, Vinhão, Trincadeira, Xara e Zinfandel</p>	<p>Alicante-Branco, Alvar, Alvarinho, Antão-Vaz, Arinto, Arinto-do-interior, Assaraky, Azal, Barcelo, Bical, Branca-de-Anadia, Cercial, Chardonnay, Chenin, Códaga-de-Larinho, Dona-Branca, Encruzado, Fernão-Pires, Folgasão, Folha-de-Figueira, Fonte-Cal, Godelho, Gouveio, Jampal, Loureiro, Luzidio, Malvasia-Fina, Malvasia-Rei, Pinot-Blanc, Rabo-de-Ovelha, Riesling, Sauvignon, Semillon, Sercial, Sercialinho, Sória, Tália, Tamarez, Terrantez, Trajadura, Uva-Cão, Verdelho, Verdial-Branco, Viognier, Viosinho e Vital</p>

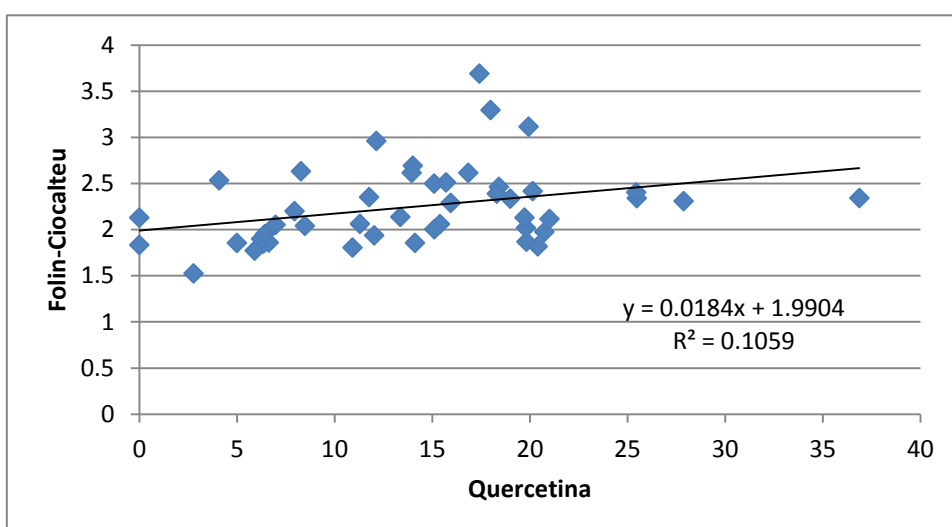
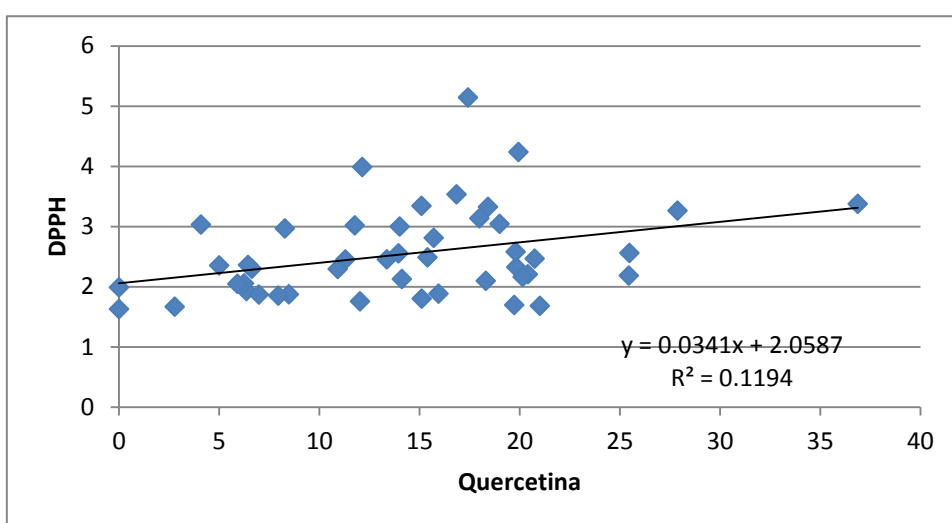
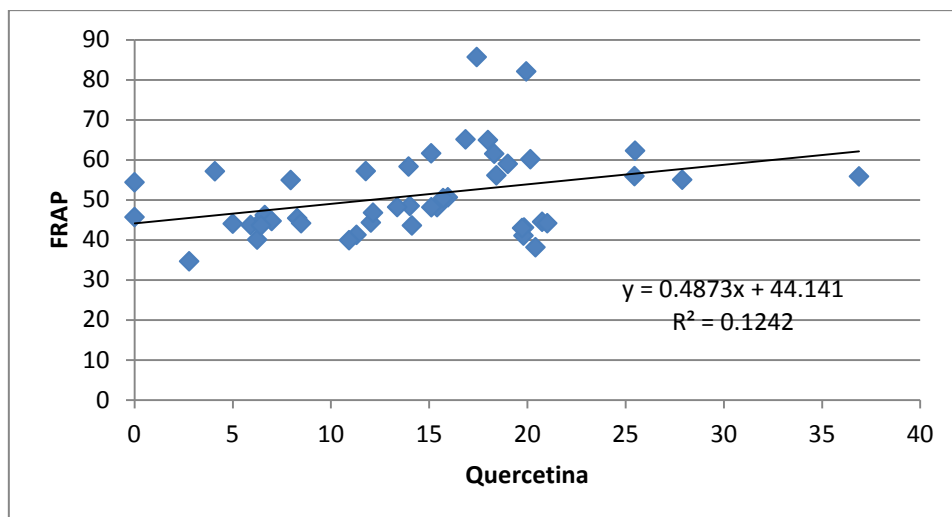
Anexo II – Gráficos de correlação entre ensaios de actividade antioxidante e compostos quantificados por HPLC

Gráficos de correlações para os vinhos tintos

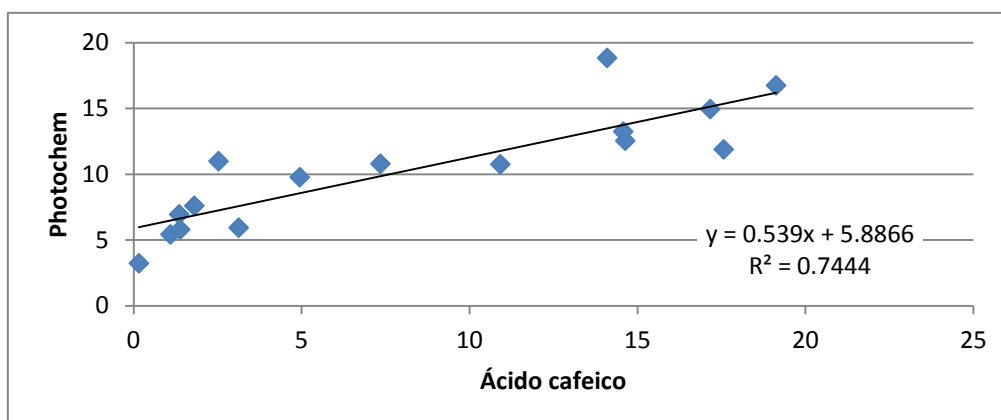
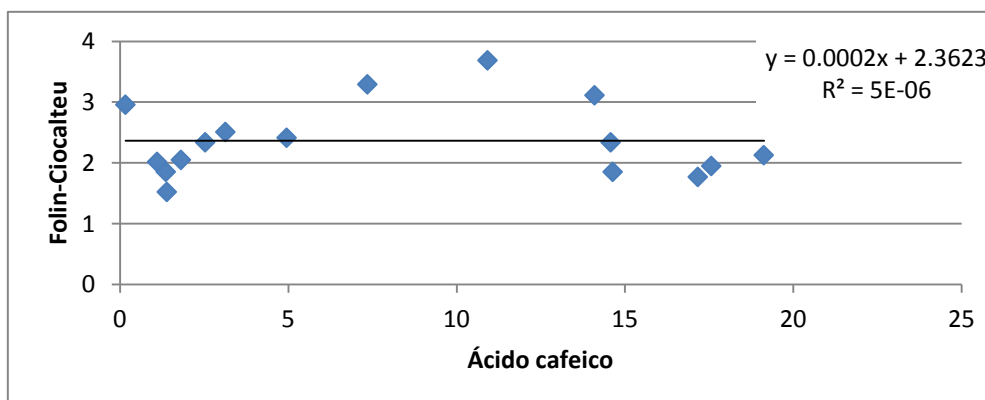
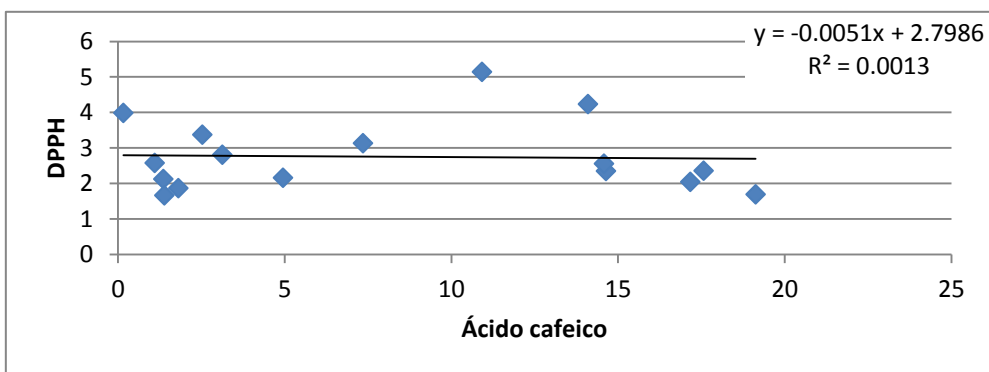
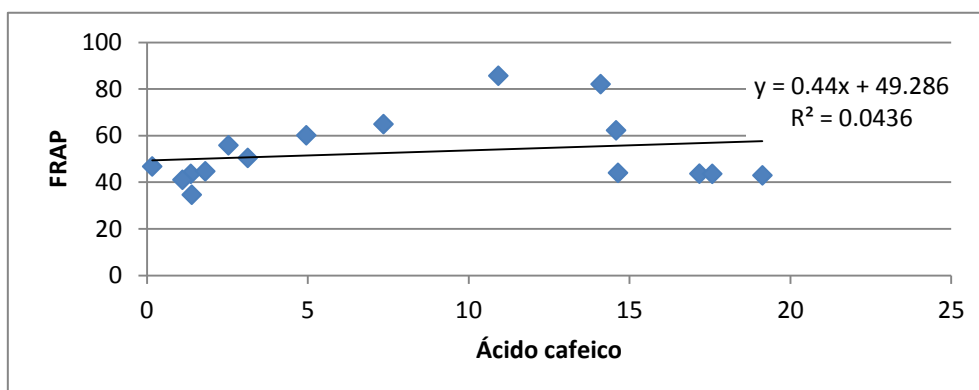


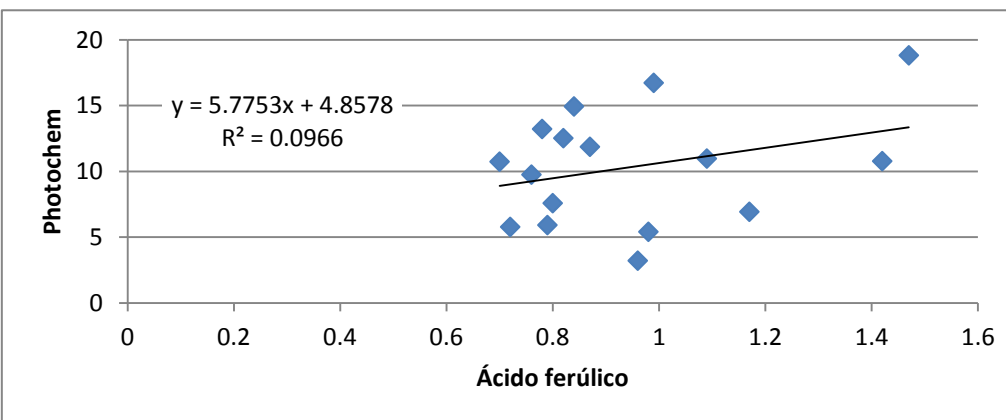
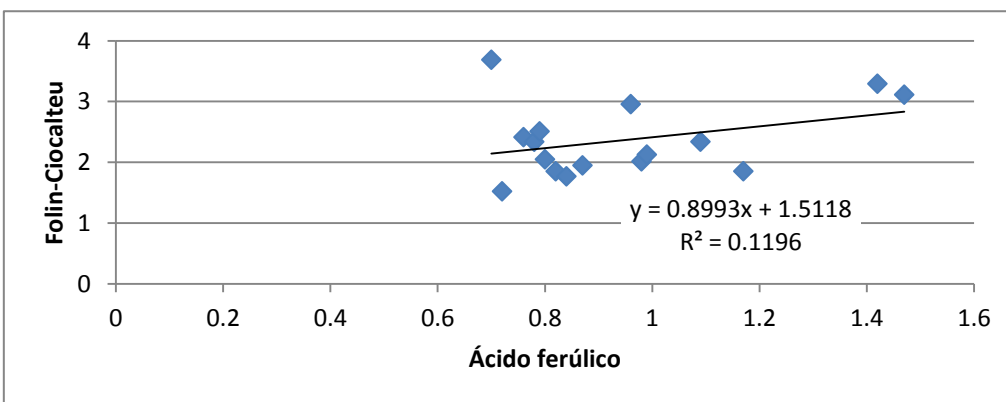
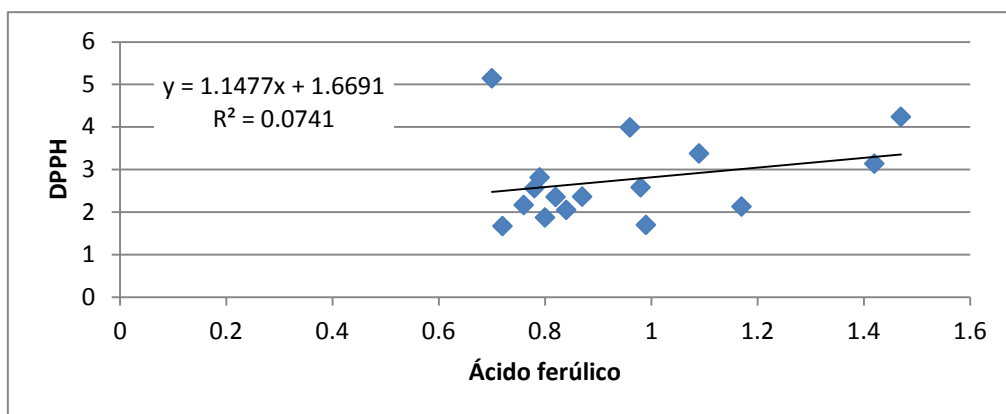
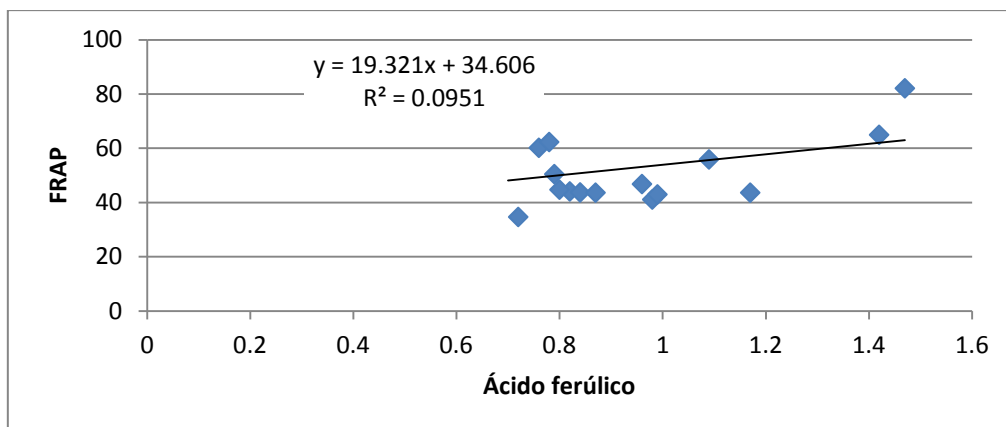


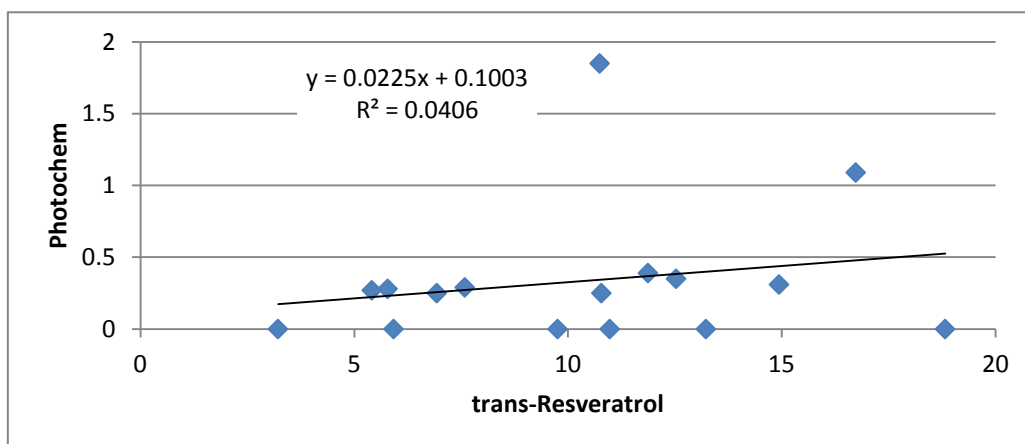
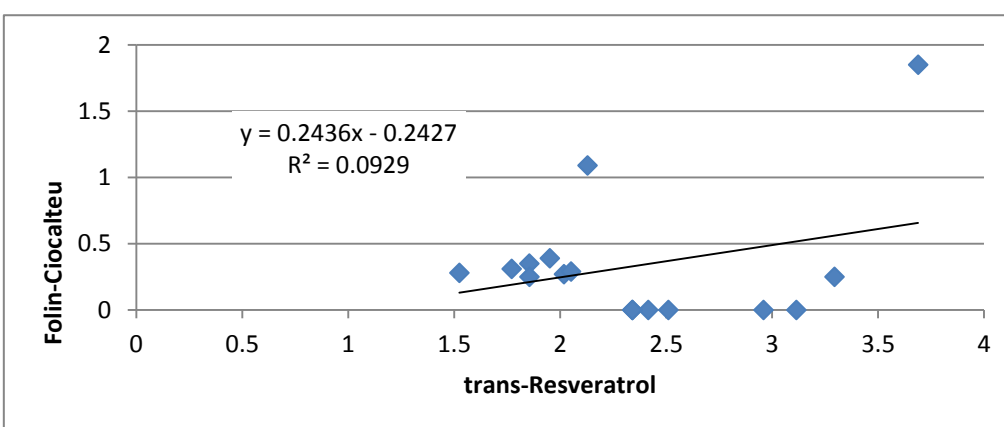
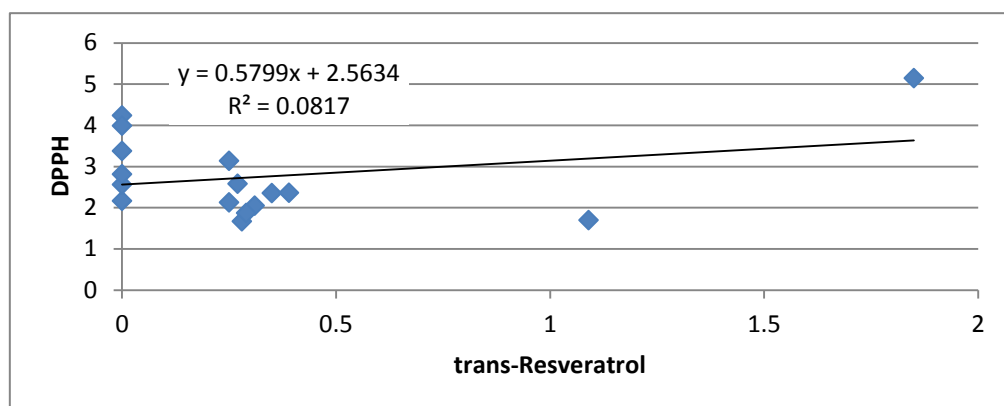
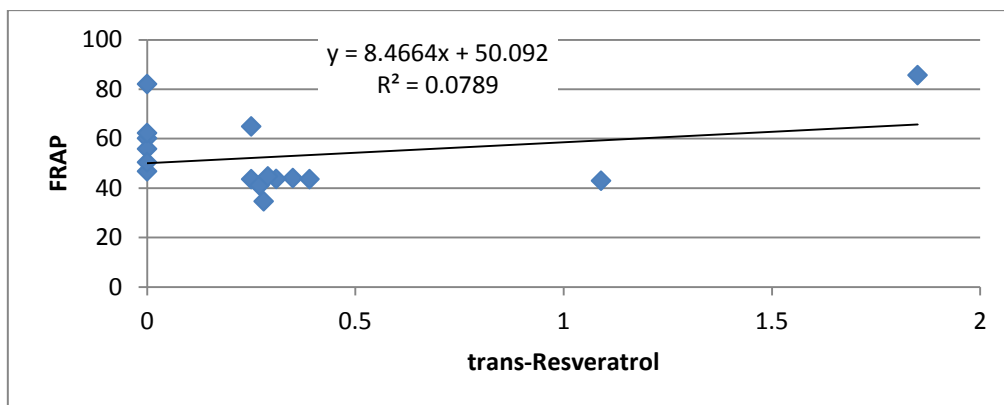




Gráficos de correlações para os vinhos brancos

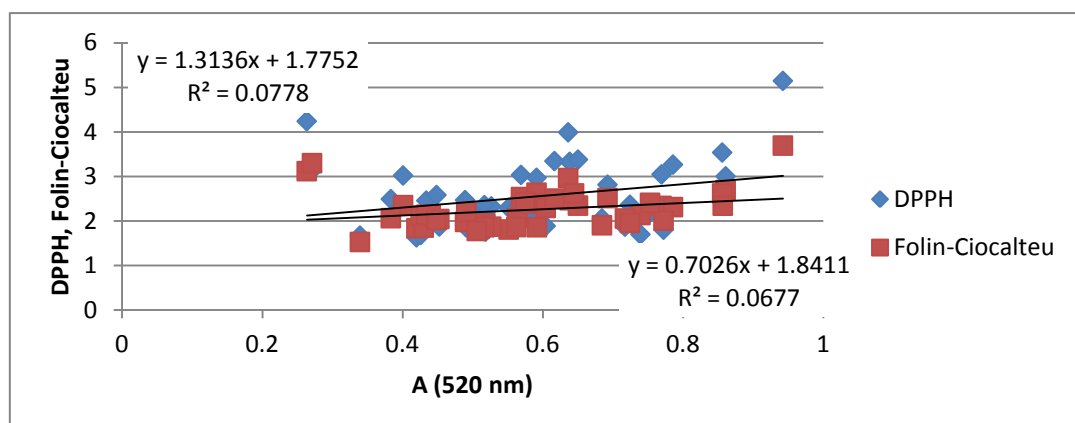
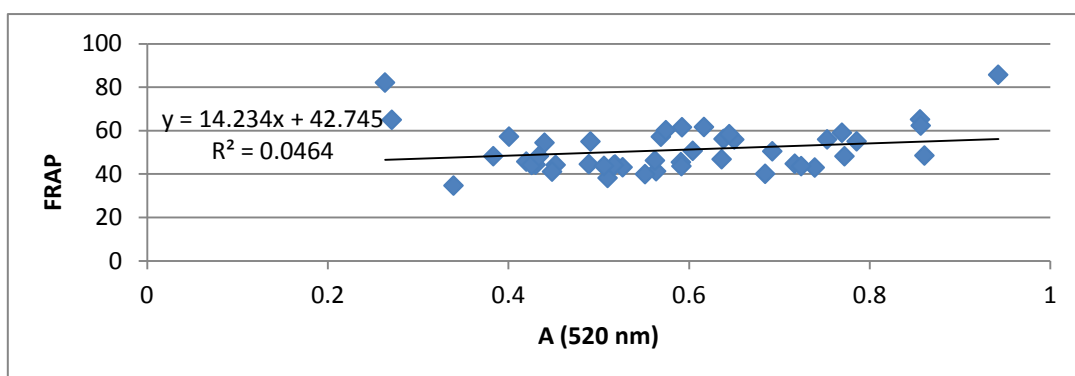
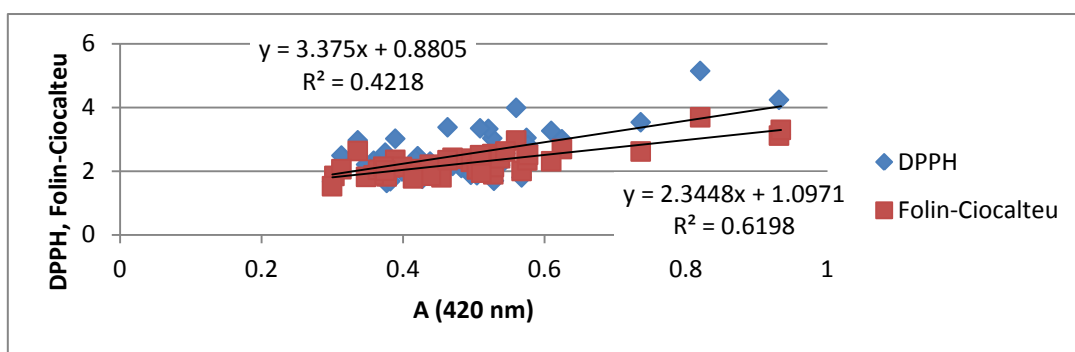
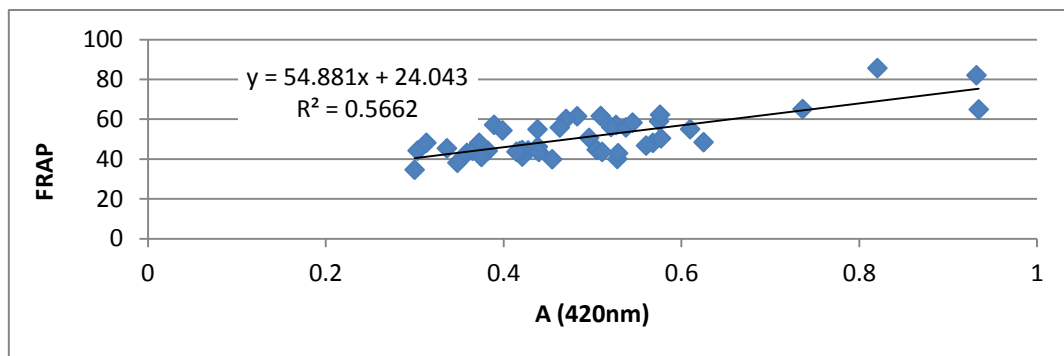


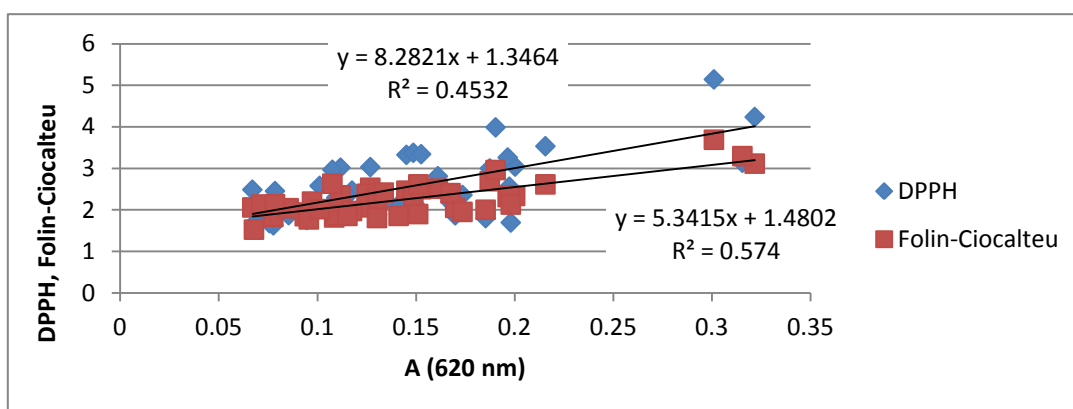
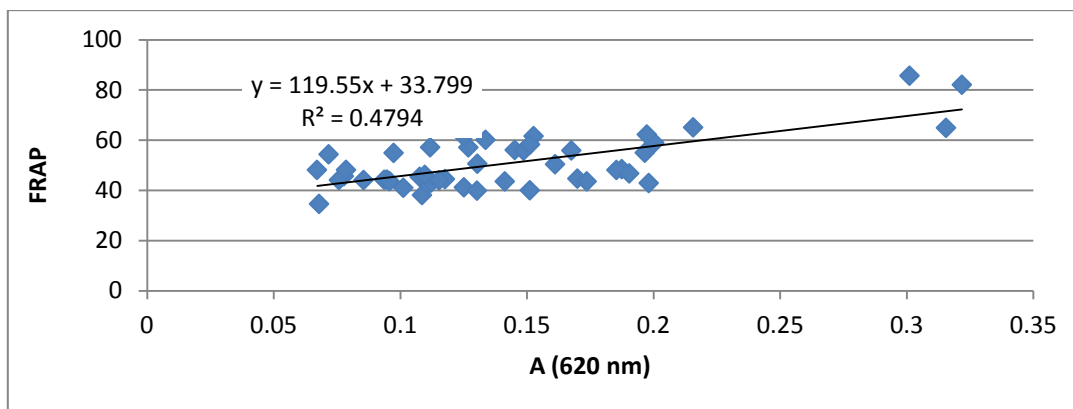




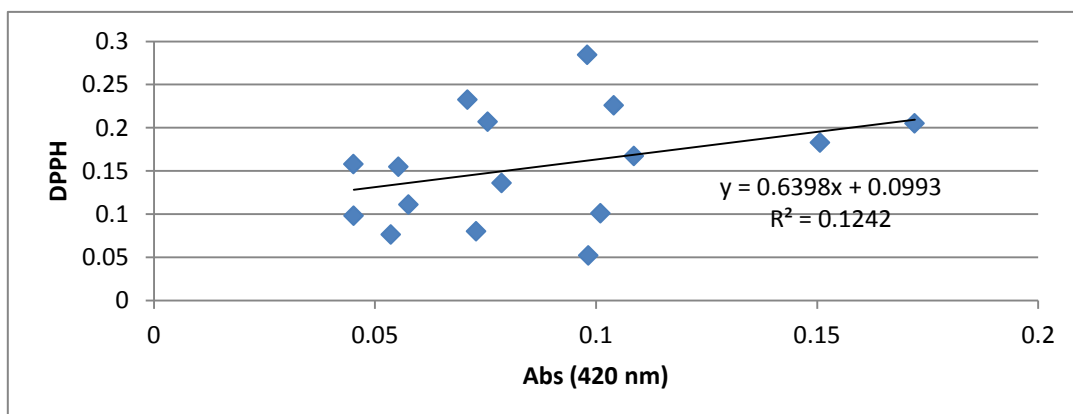
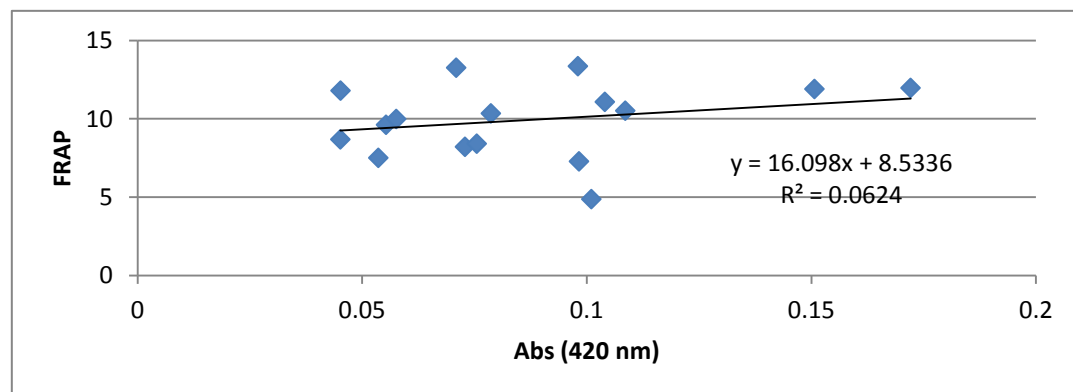
Anexo III – Gráficos de correlação entre ensaios de actividade antioxidante e as absorvâncias lidas a 420, 520 e 620 nm.

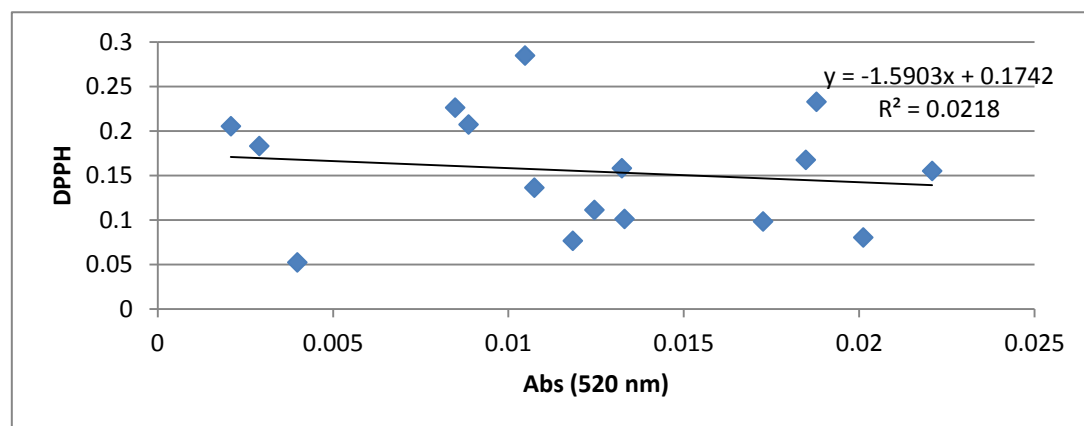
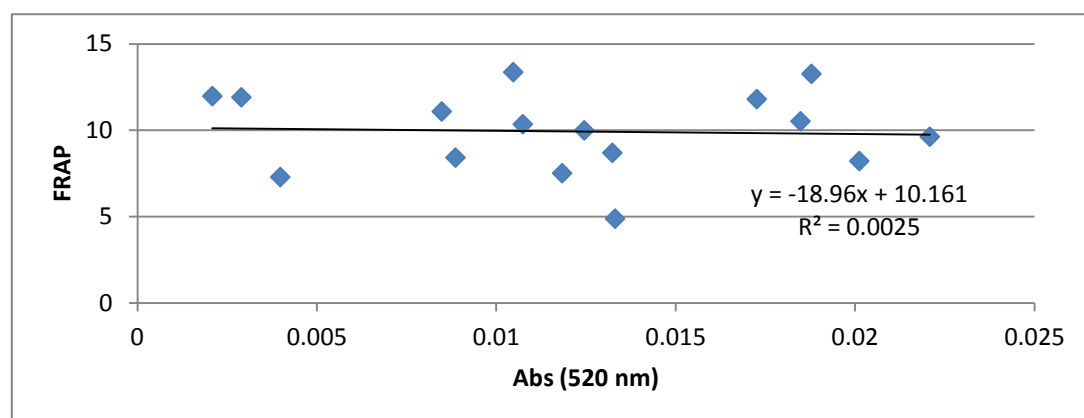
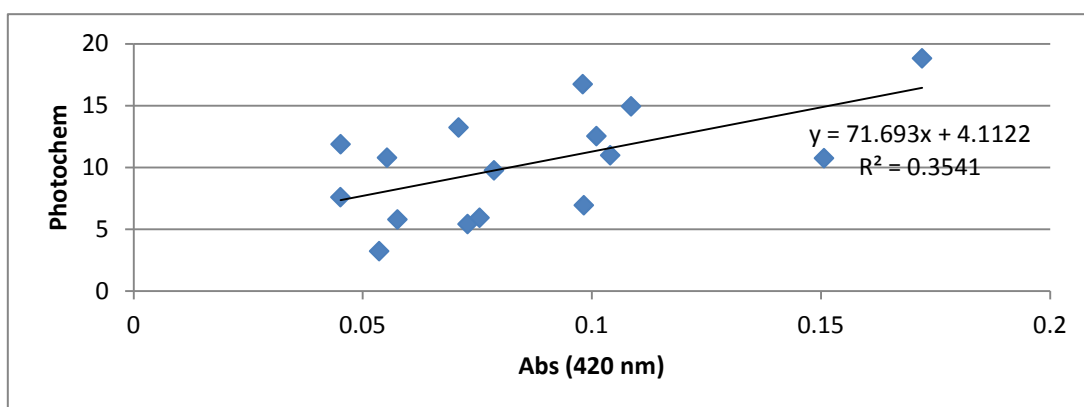
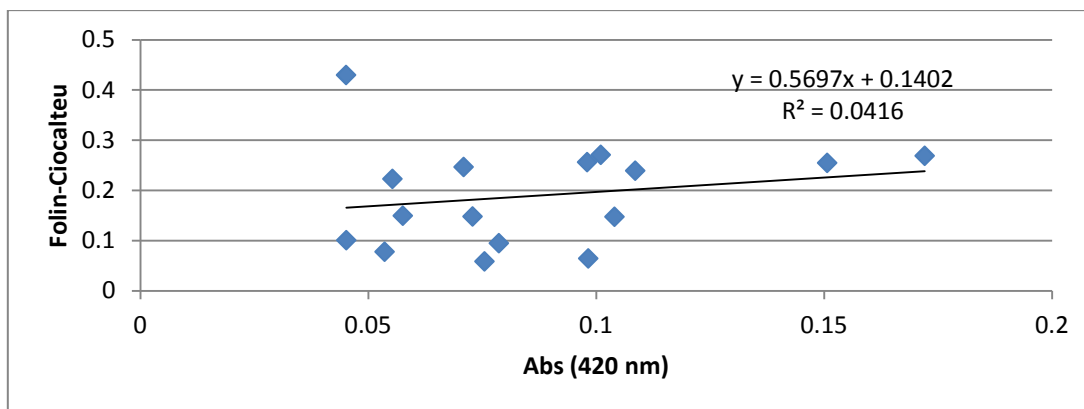
Gráficos de correlações para os vinhos tintos

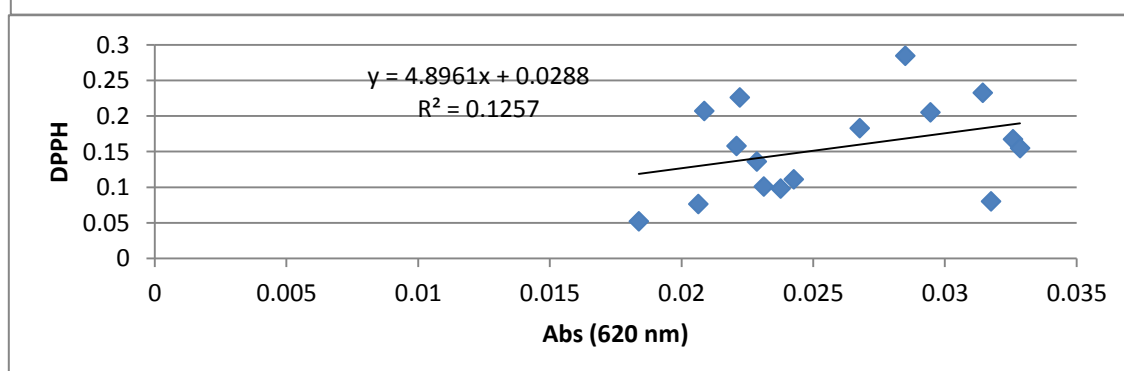
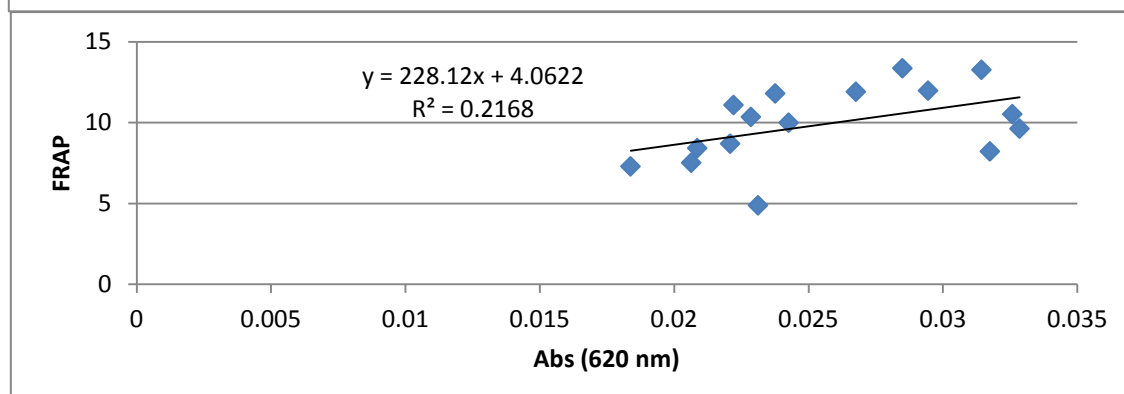
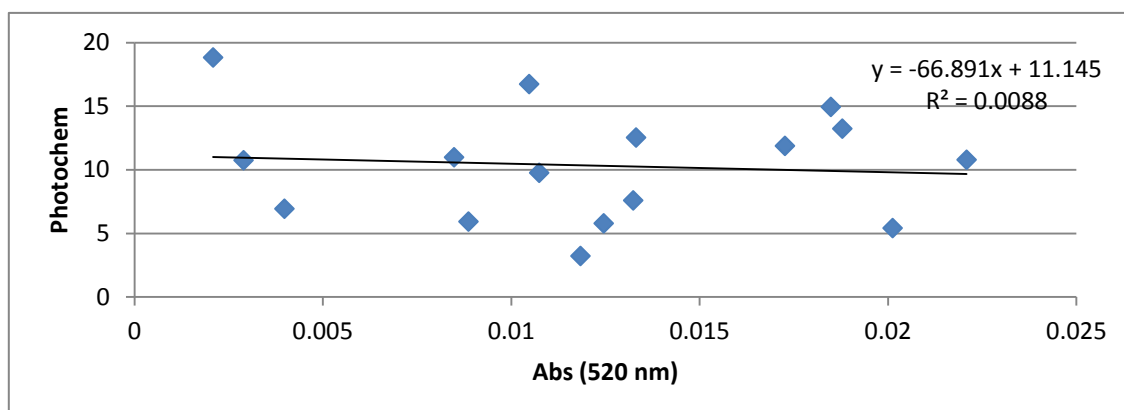
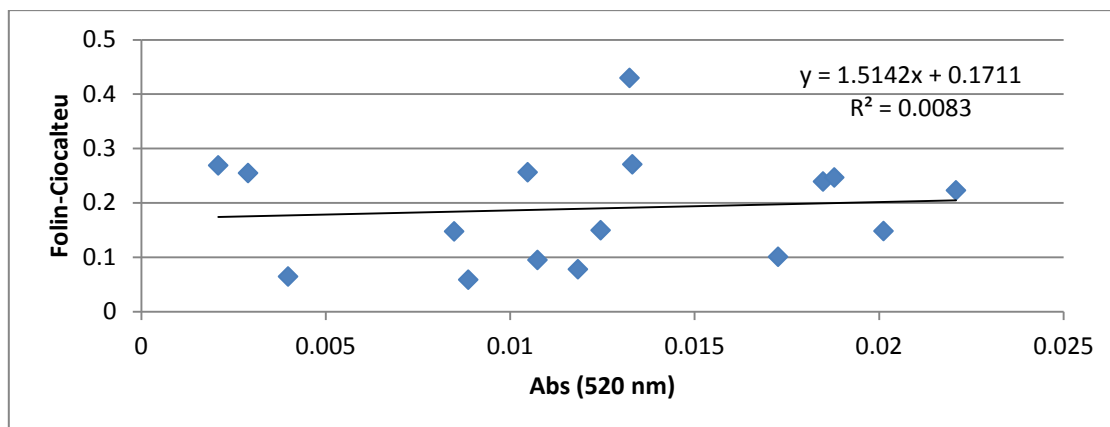


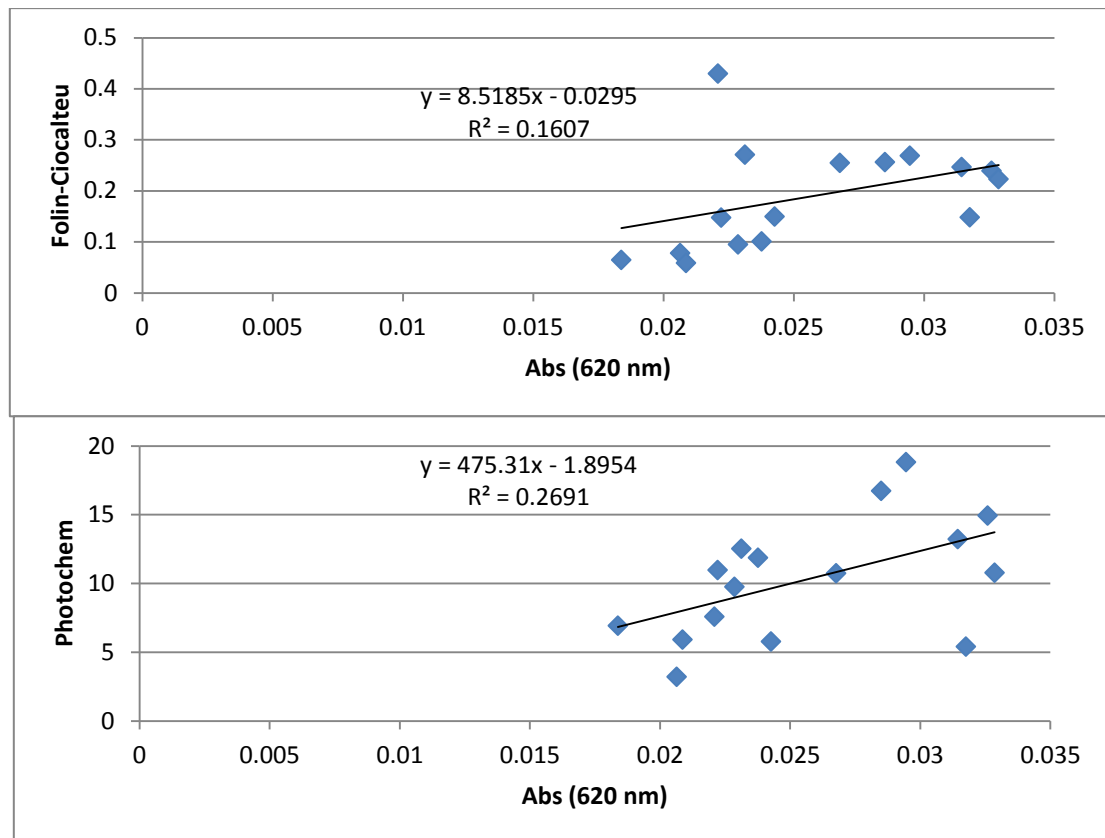


Gráficos de correlações para os vinhos brancos

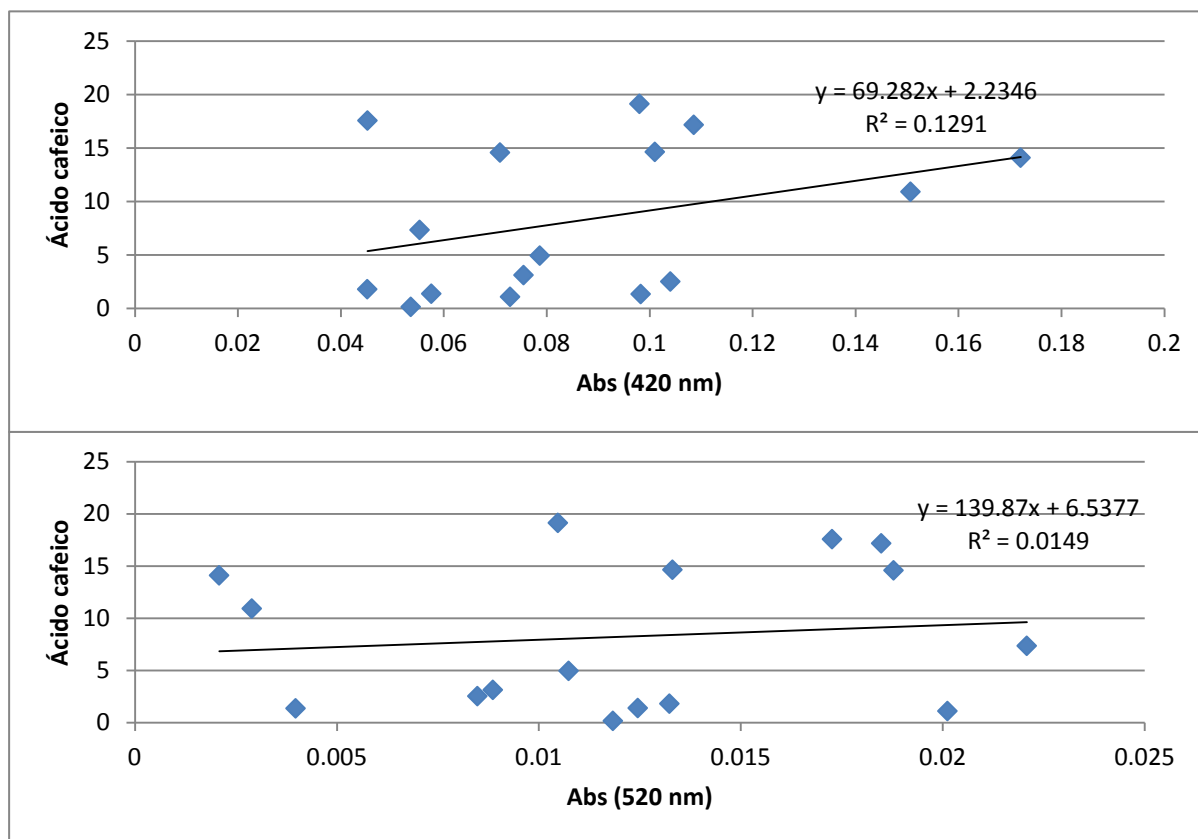


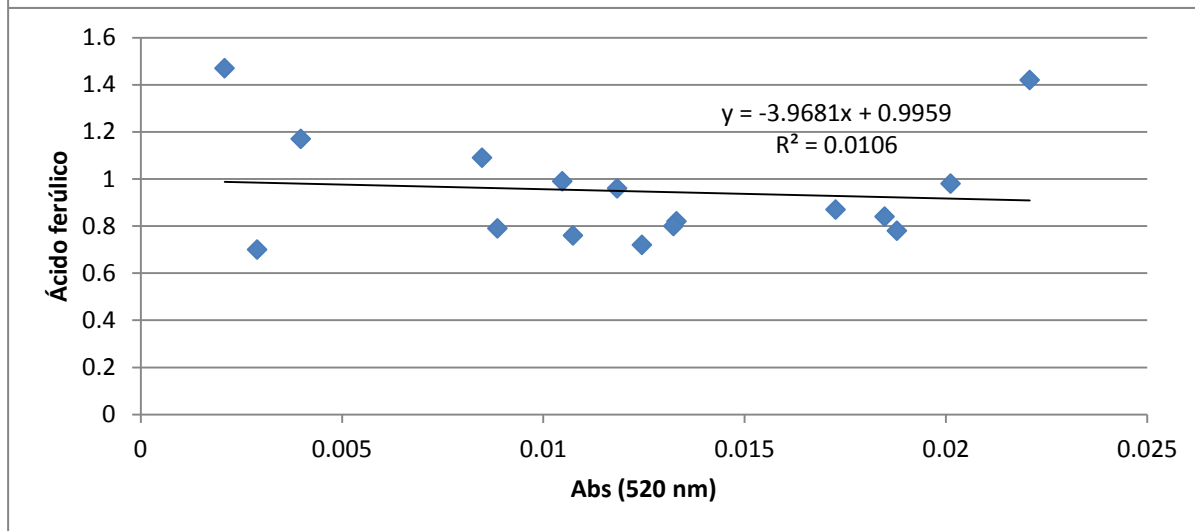
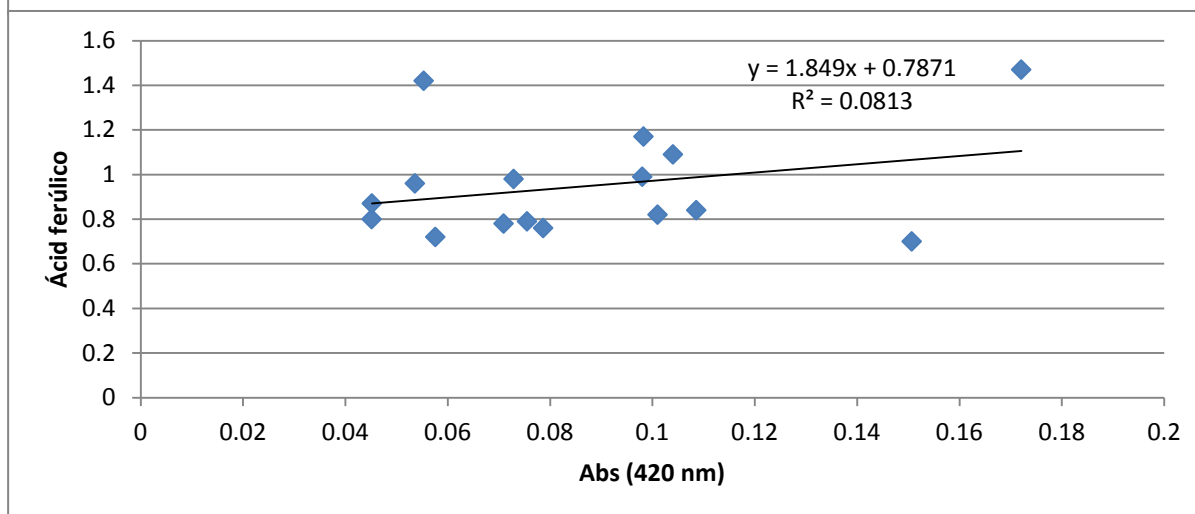
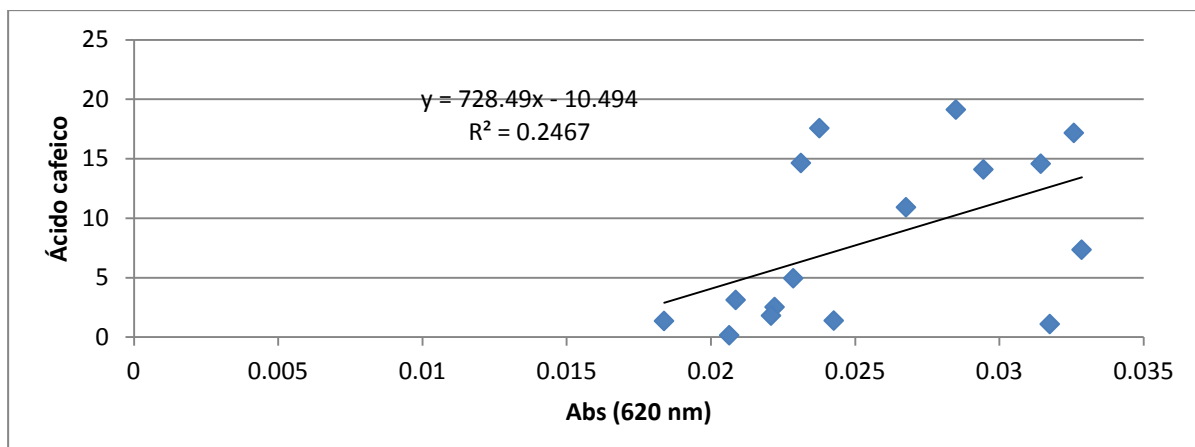


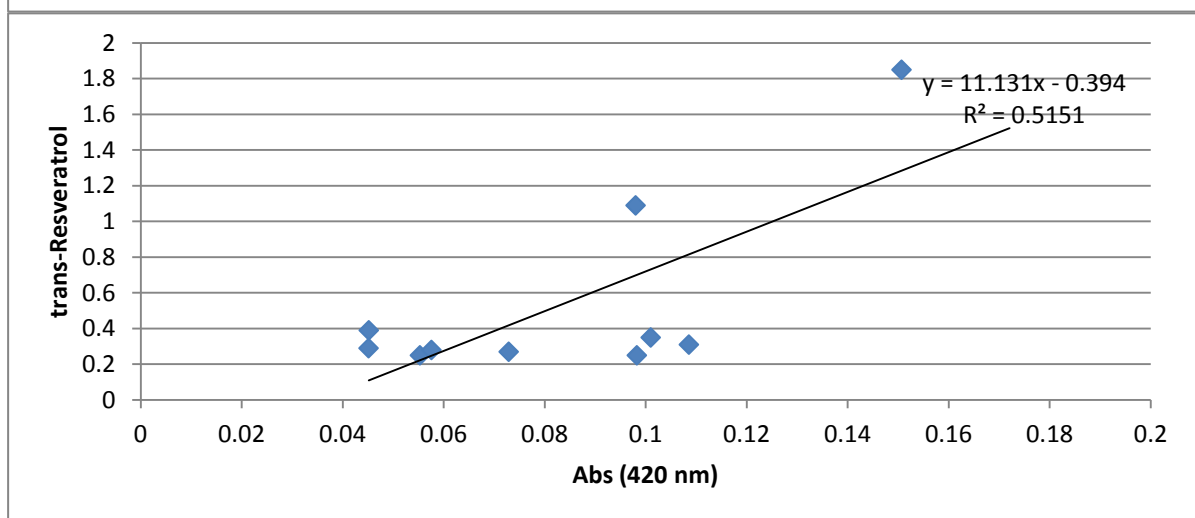
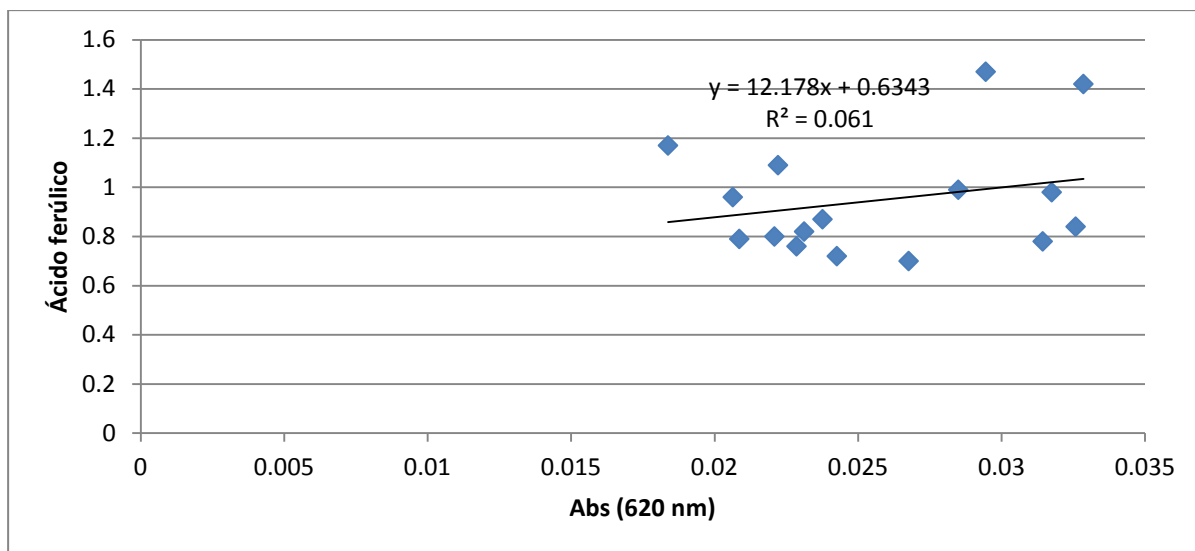


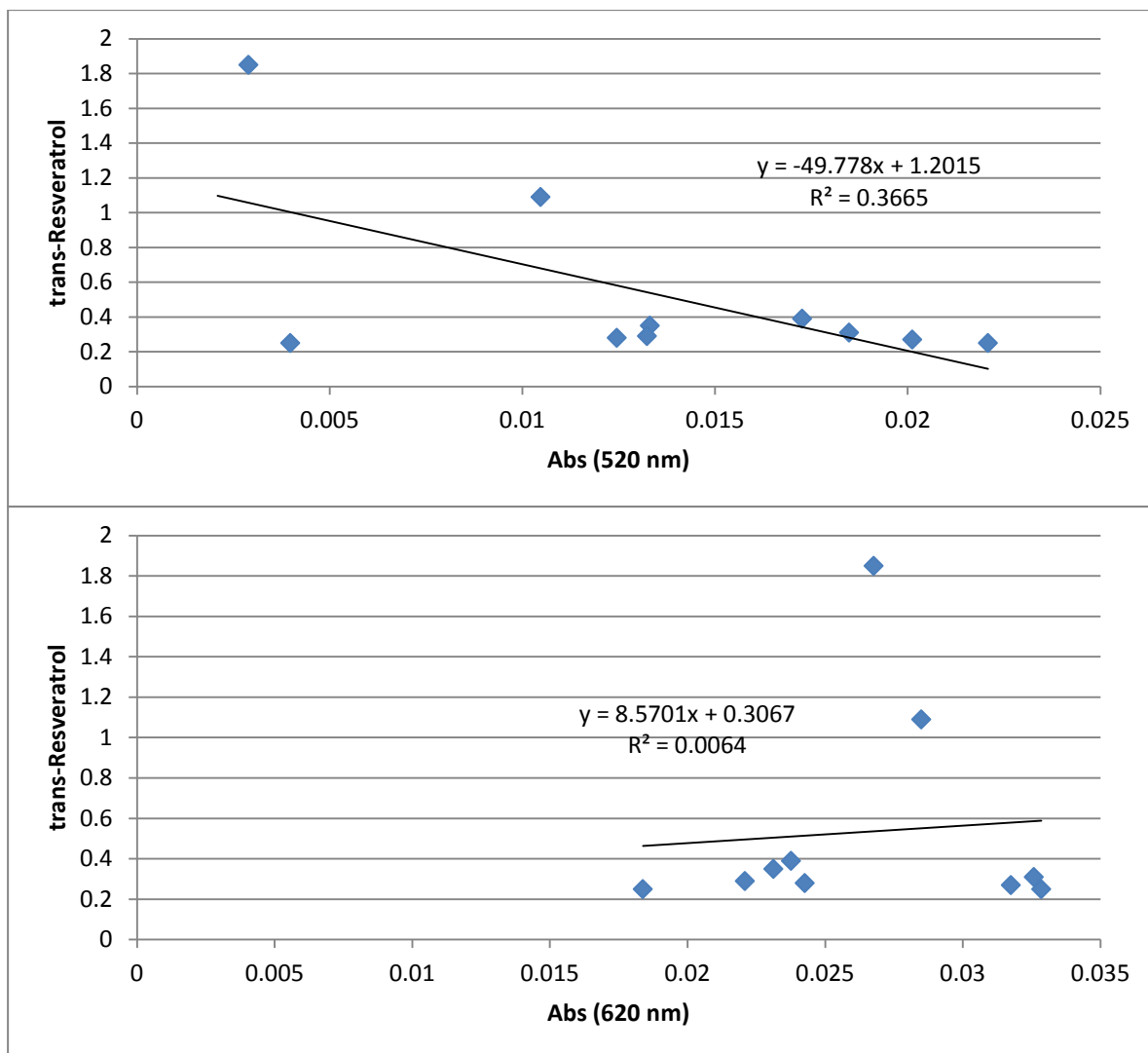


Anexo IV – Gráficos de correlação entre as absorvâncias lidas a 420, 520 e 620 nm e os compostos quantificados por HPLC nos vinhos brancos.

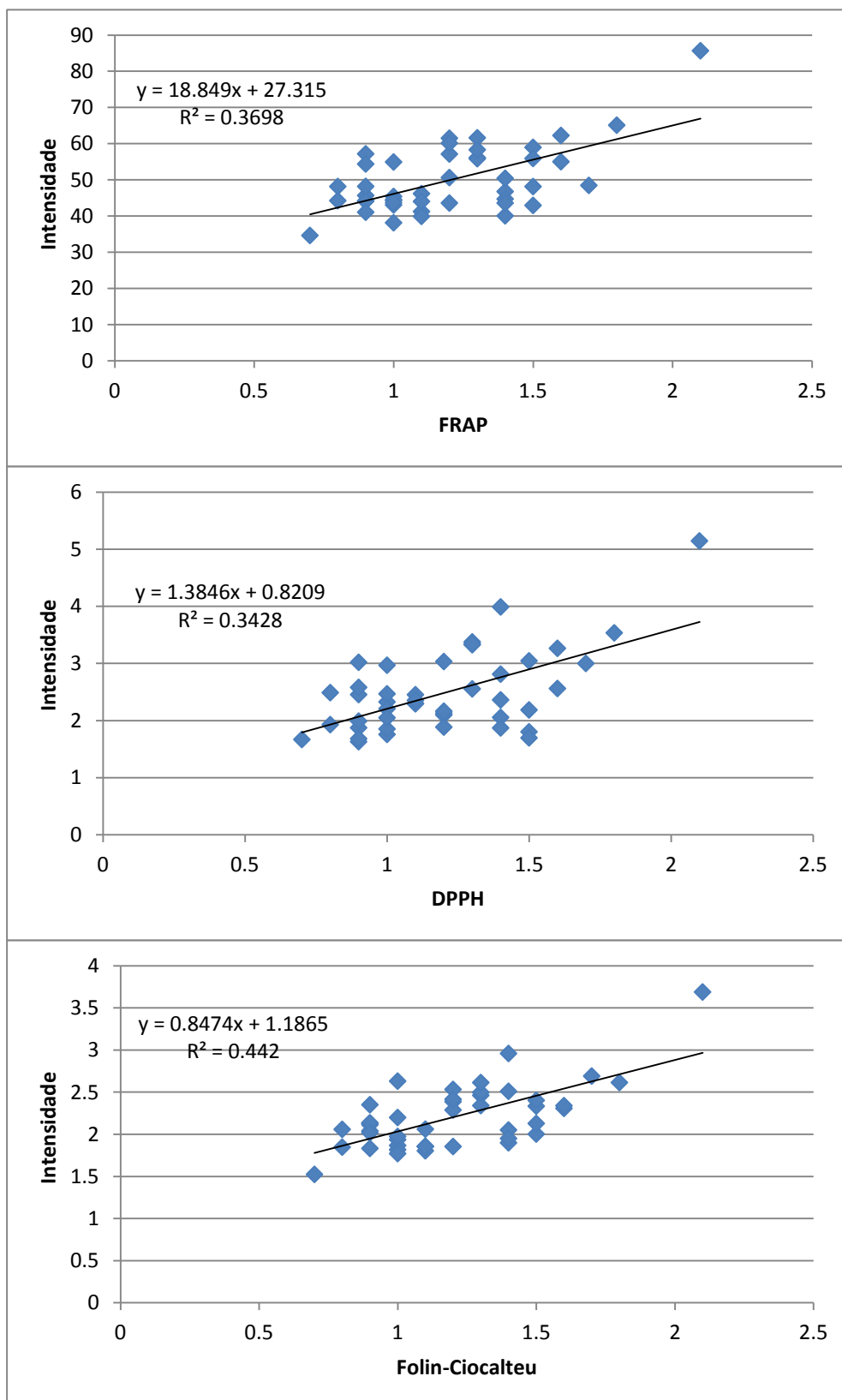


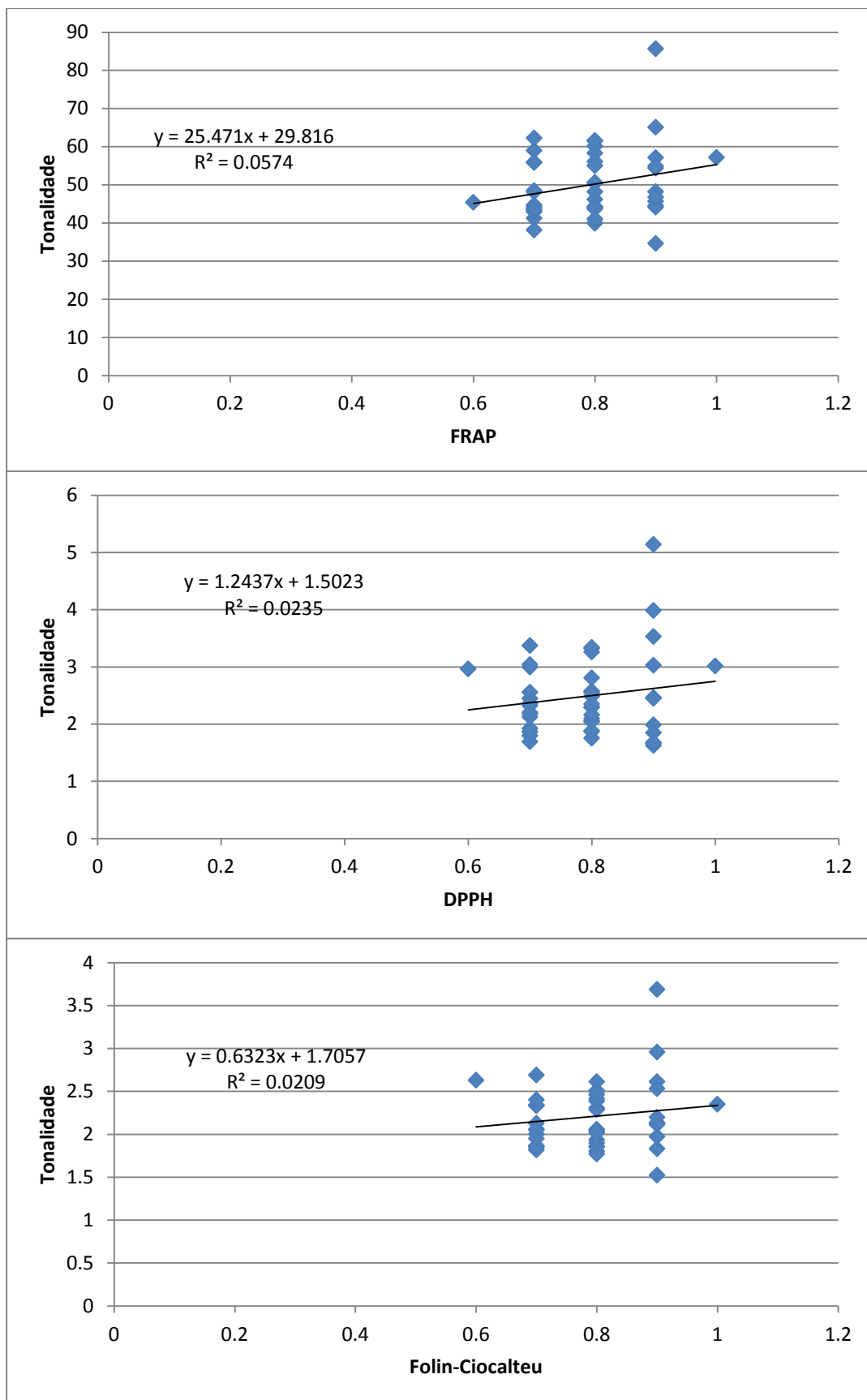


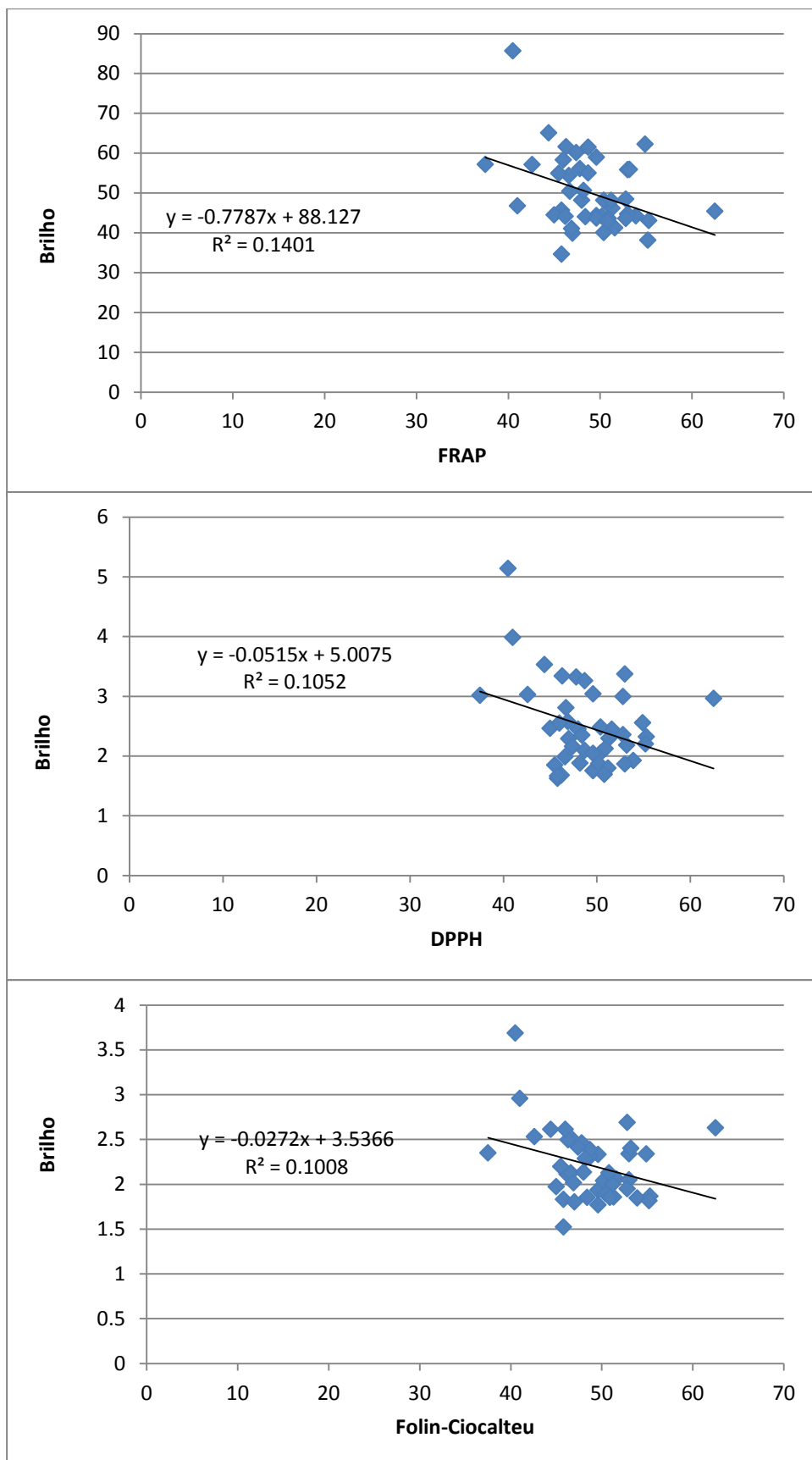


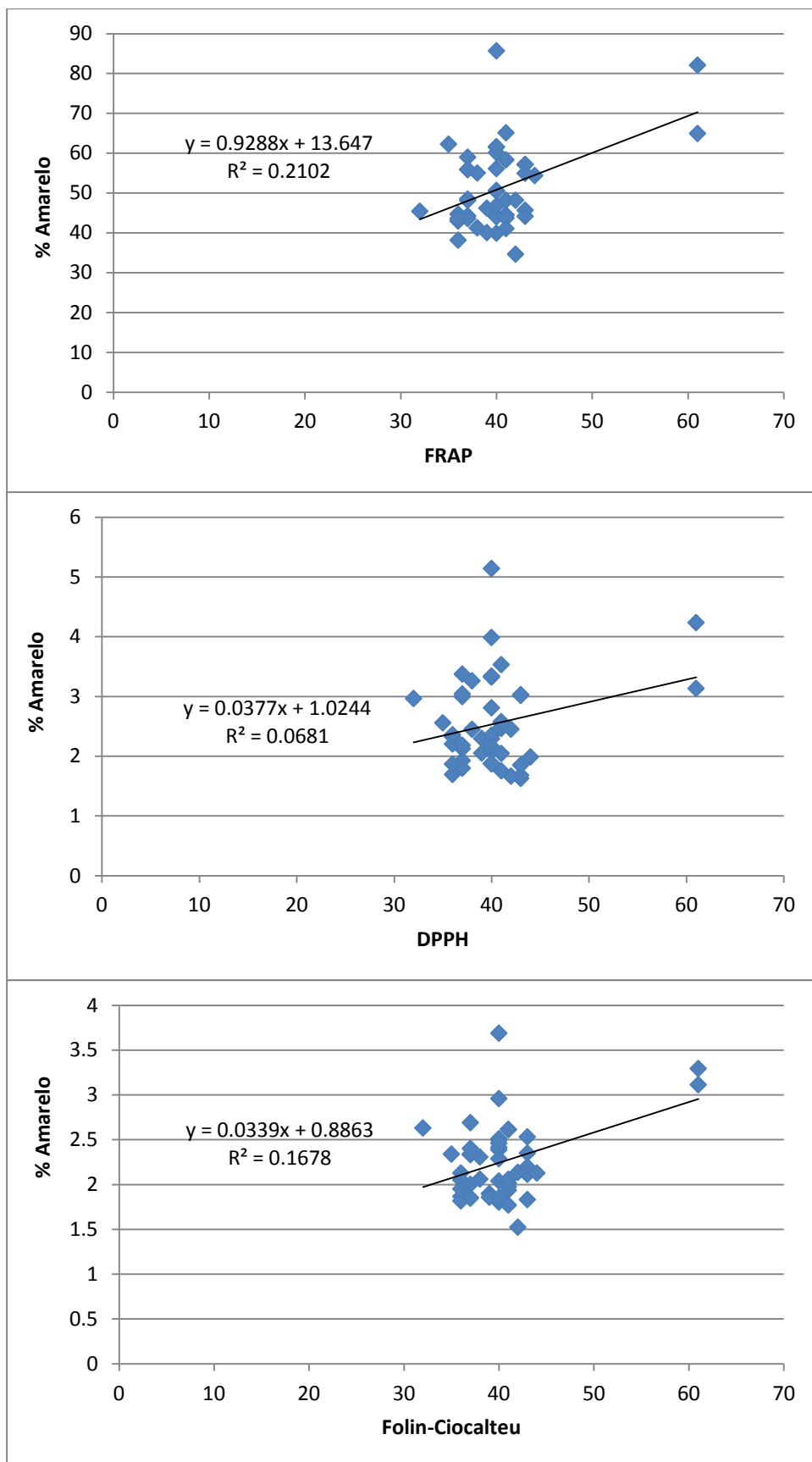


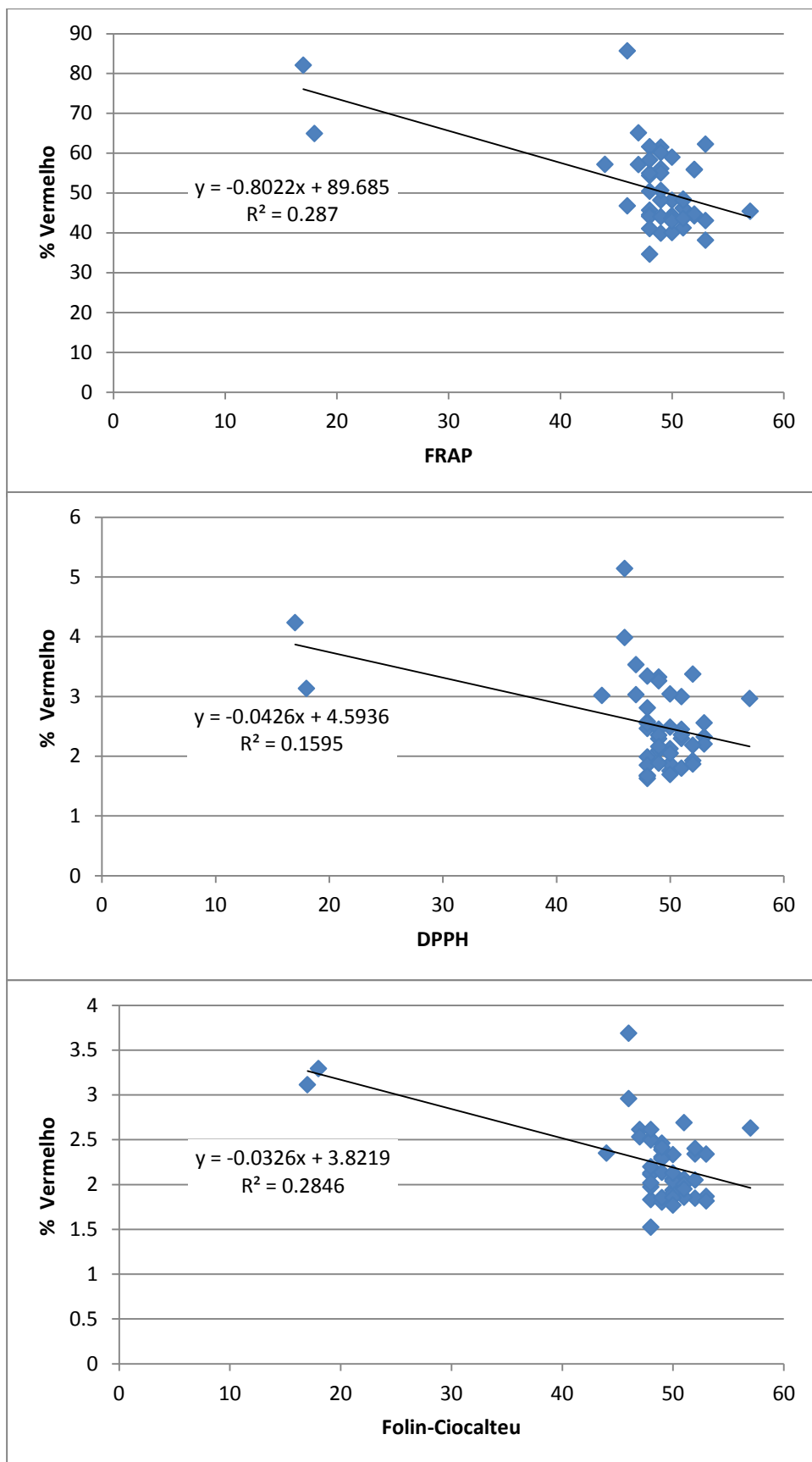
Anexo V – Gráficos de correlação entre os parâmetros de cor e os ensaios de actividade antioxidante em vinhos tintos.

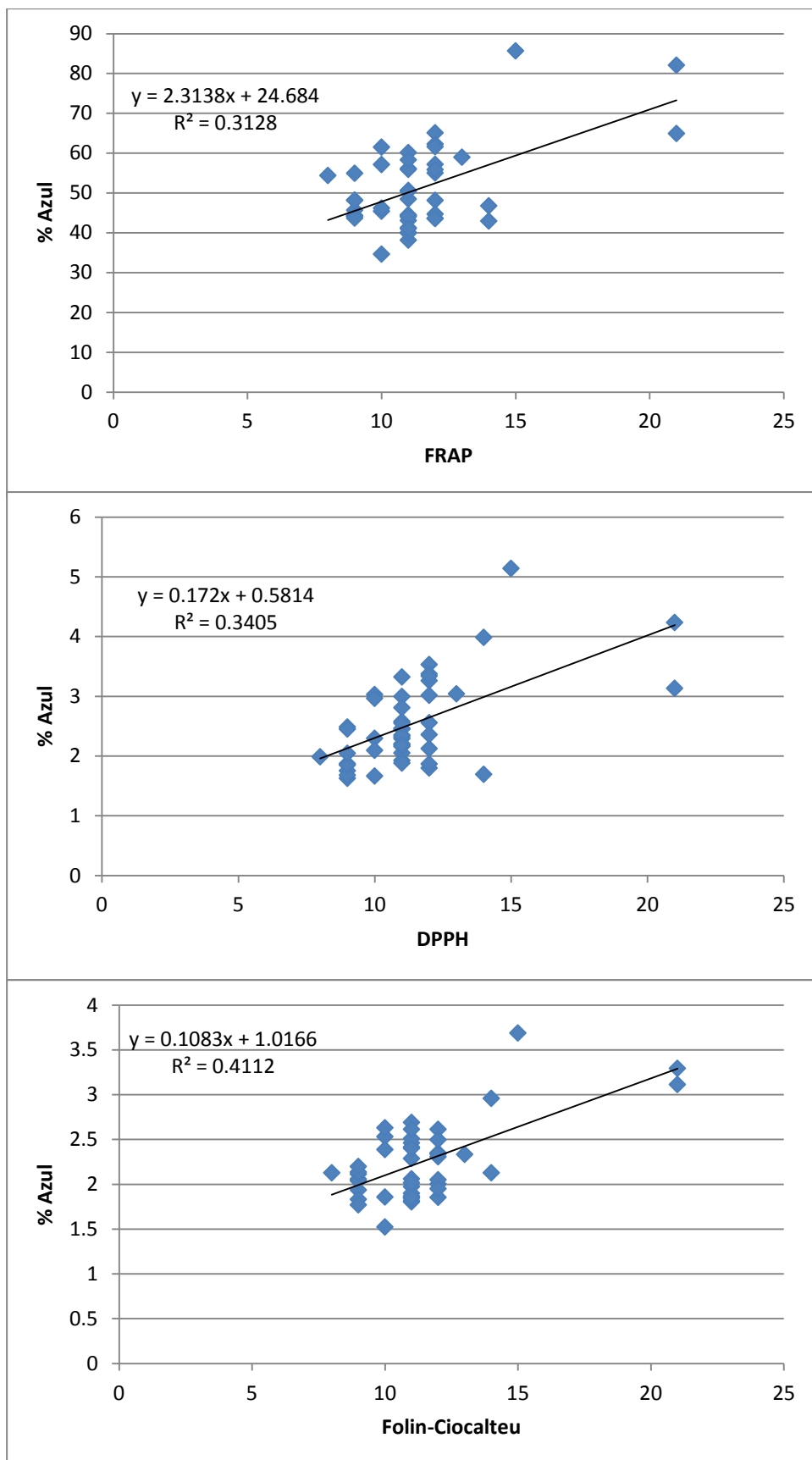






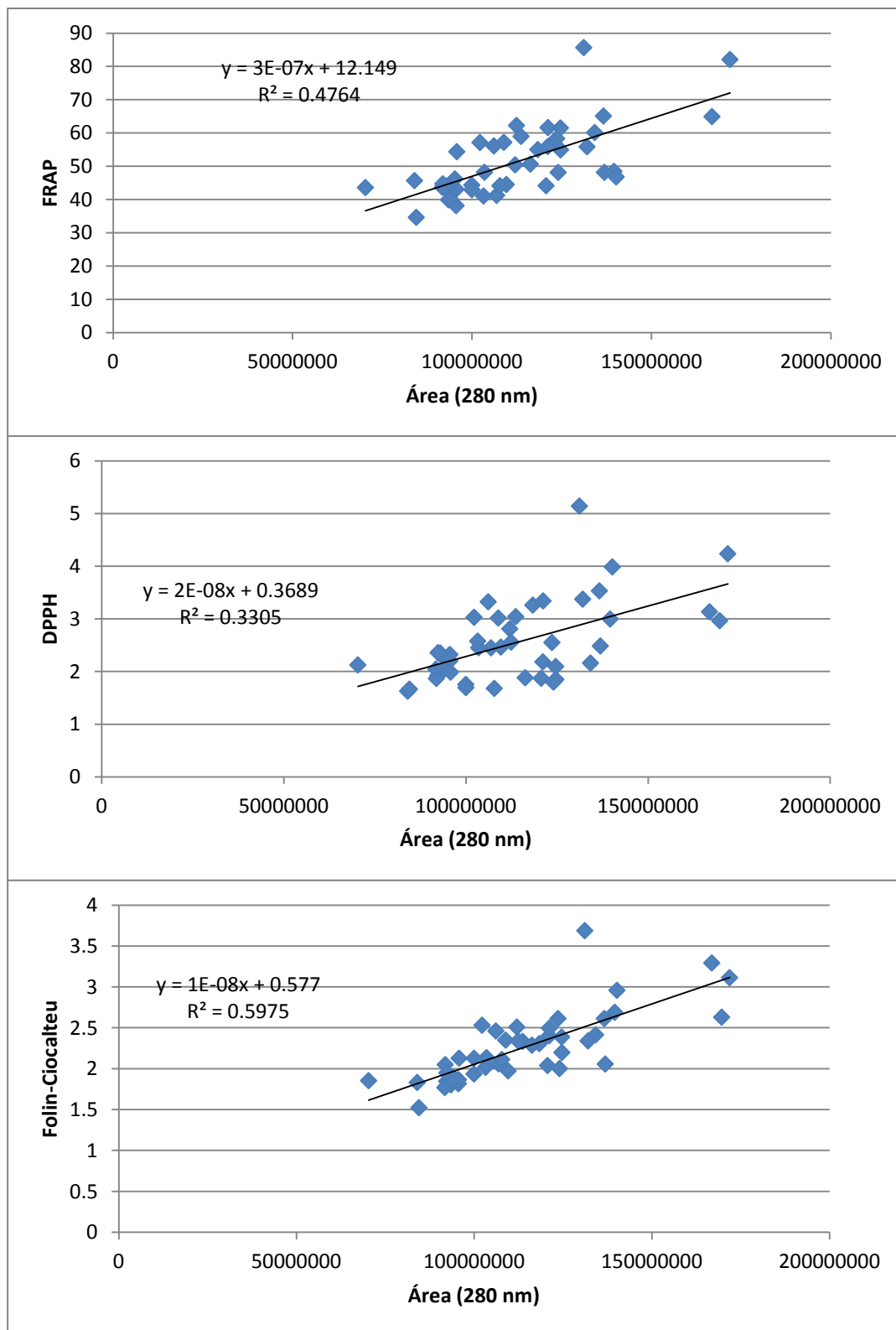


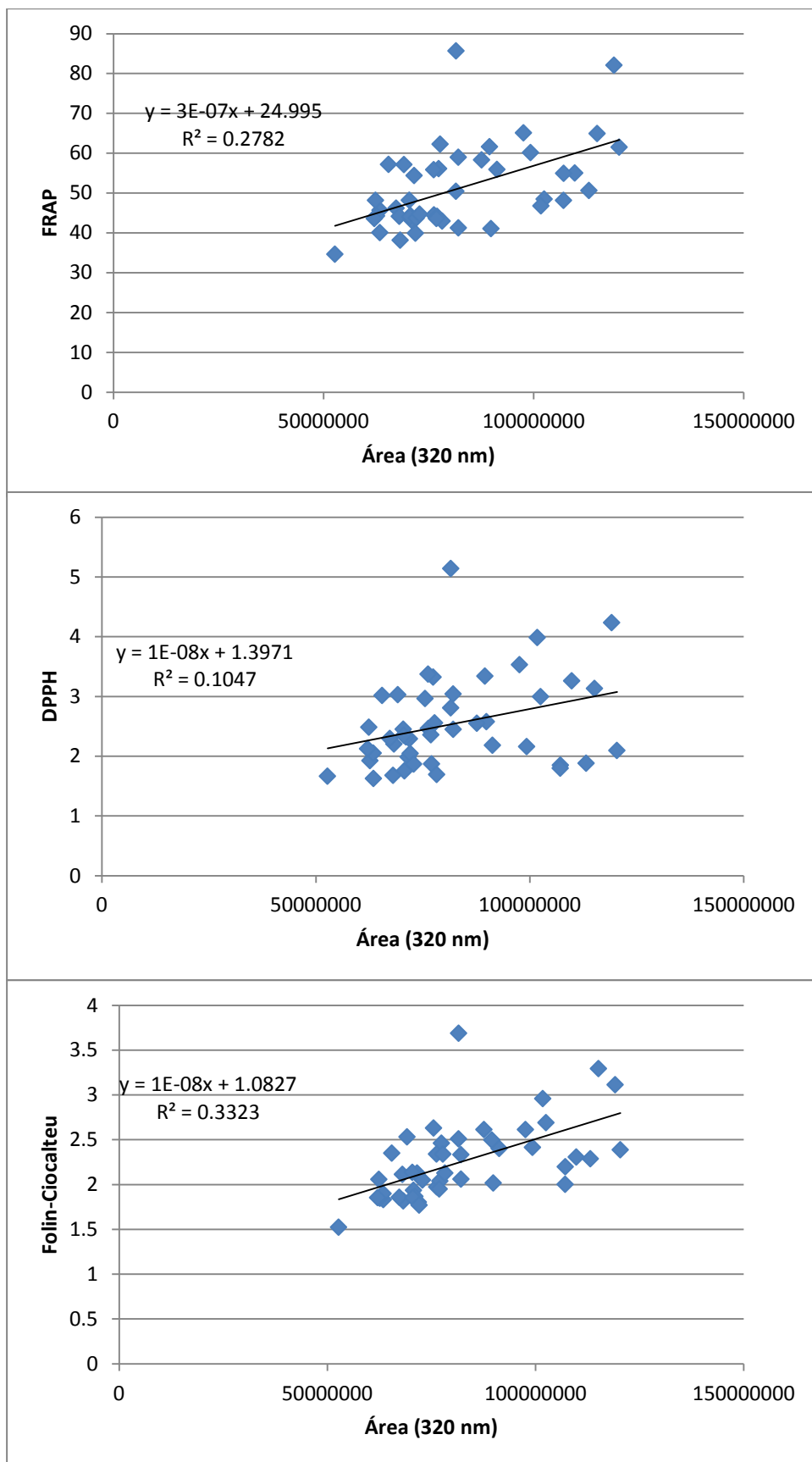


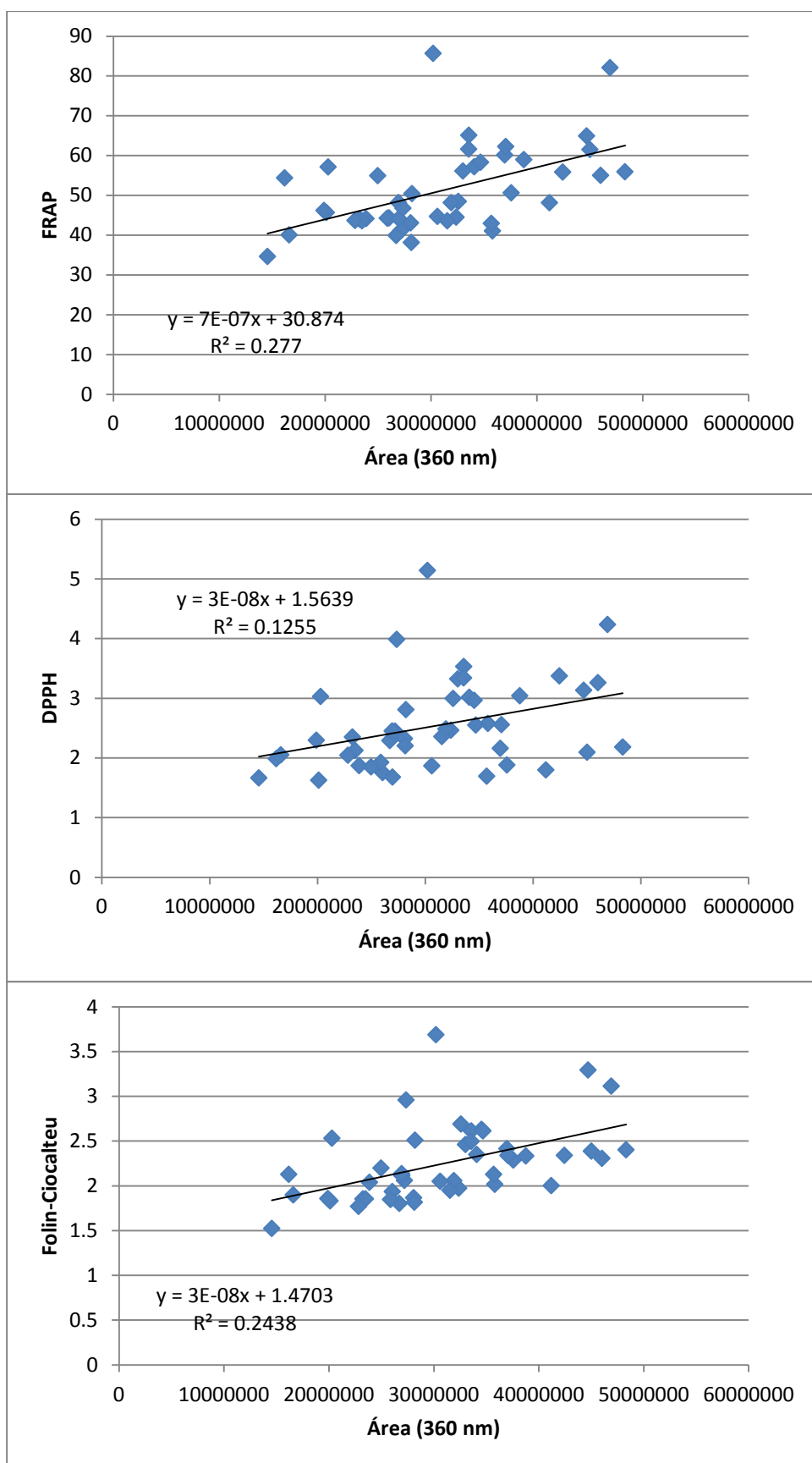


Anexo VI – Gráficos de correlação entre os ensaios de actividade antioxidante e as áreas dos cromatogramas extraídas a 280, 320 e 360 nm.

Gráficos de correlações em vinhos tintos.







Gráficos de correlações em vinhos brancos

